

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA MATHIAS DÖLL BOSCARDIN

MORFOANATOMIA, FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE  
*Eucalyptus benthamii* MAIDEN *ET* CAMBAGE – MYRTACEAE

CURITIBA  
2009

**PATRÍCIA MATHIAS DÖLL BOSCARDIN**

**MORFOANATOMIA, FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE  
*Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CAMBAGE – MYRTACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Tomoe Nakashima  
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

**CURITIBA  
2009**

Boscardin, Patrícia Mathias Döll  
Morfoanatomia, fitoquímica e atividade biológica de folhas de  
*Eucalyptus benthamii* Maiden *et* Cambage - Myrtaceae / Patrícia  
Mathias Döll Boscardin – Curitiba, 2009.  
139 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Dra. Professora Tomoe Nakashima  
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Insumos,  
Medicamentos e Correlatos.  
Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus benthamii*. 2. Myrtaceae. 3. Óleo essencial.  
4. CG/MS. 5. Polifenóis. 6. Atividade antioxidante. I. Nakashima,  
Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1

Dedico este trabalho ao meu esposo, Rodrigo.  
Aos meus pais, Maria Lídia e Manfredo.  
Aos meus irmãos, Karine e Luciano.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e mais esta oportunidade de aprendizado.

À Professora Dra. Tomoe Nakashima pela orientação, confiança, amizade e paciência, além do constante estímulo no desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Professor Dr. Paulo Vitor Farago, pela orientação, paciência e incentivo. Paulo, sua orientação foi uma lição para mim. Agradeço por todas as vezes que você disponibilizou parte de seu fim de semana para me ajudar com os artigos e com a dissertação. Agradeço a amizade, o companheirismo e os momentos de descontração. E, agradeço, especialmente, por você ter me acolhido e acreditado sempre na minha capacidade, desconsiderando ressentimentos anteriores, o que demonstra ainda mais a sua grandiosidade como ser humano.

À Professora MSc. Rosilda Aparecida Kovaliczn, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela disponibilidade em me auxiliar nos ensaios com os espécimes de *Pediculus humanus capitis*.

À Professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio com a execução da cromatografia gasosa.

Aos taxonomistas Professor Dr. Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e Osmar dos Santos Ribas, do Museu Botânico Municipal, pela identificação da espécie.

Ao Dr. Paulo Eduardo Telles, da Embrapa Florestas, pela doação do material botânico.

À Professora Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que desde os tempos de iniciação científica me acompanha e me incentiva nessa caminhada. Agradeço, especialmente, a amizade e o acolhimento no Laboratório de Produtos Farmacêuticos do Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-graduação.

À aluna de iniciação científica da Universidade Federal do Paraná, Simone Yae Abe, pela amizade, convivência e colaboração na realização dos experimentos.

À amiga e colega do mestrado, Letícia Rocha Loures Malinowski, pela amizade, companheirismo e auxílio constante.

Aos amigos do “Quarteto Fantástico”, Simone Cristina Déo, Andressa Frizzo Philippsen e Bruno Stefanello Vizzotto, que me fizeram acreditar que seria possível dar boas risadas mesmo durante a complicada fase do nivelamento.

Às colegas e amigas Débora Maria Borsato, Isabela Goeldner da Silva, Milena Kalegari, Patrícia Mazurek Campos, Sayonara Mendes e Stella Siu Ló pelo companheirismo e pela amizade.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por permitir esta oportunidade de crescimento técnico-científico.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A todos, que mesmo não citados, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

*"Le véritable voyage de découverte ne consiste pas à chercher  
de nouveaux paysages, mais à avoir de nouveaux yeux."*

(Marcel Proust)

## RESUMO

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage é uma árvore originária da Austrália e uma das espécies mais empregadas para o reflorestamento no sul do Brasil, demonstrando um crescimento acelerado e uma resistência elevada ao frio. O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da morfoanatomia foliar, bem como determinar a composição química e avaliar a atividade antioxidante, o efeito antimicrobiano e o potencial inseticida do óleo essencial de *E. benthamii*. O material botânico foi coletado durante o outono e a primavera na Embrapa Florestas, no município de Colombo (Paraná). A partir dos métodos usuais de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura, foram evidenciados estômatos anomocíticos em ambas as faces do limbo foliar de *E. benthamii*, ausência de tricomas, mesofilo heterogêneo simétrico, nervura mediana plano-convexa, idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio, cavidades secretoras com conteúdo lipofílico e súber cicatricial. A pesquisa de metabólitos secundários no extrato aquoso e no extrato hidroetanólico proveniente das folhas estabilizadas de *E. benthamii* revelou a presença de triterpenos e/ou esteróides, glicosídeos flavônicos, glicosídeos saponínicos, taninos, ácidos fixos, ácidos voláteis, aminogrupos e leucoantocianidinas. Por hidrodestilação, foram obtidos valores de rendimento de 1,13 e 1,38% para o óleo volátil das folhas adultas e dessecadas de *E. benthamii*, respectivamente para as coletas de outono e de primavera. Os principais componentes do óleo essencial identificados por CG/EM, para ambas as coletas, foram:  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, *p*-cimeno, aromadendreno, globulol e terpin-4-ol. Pelo método fosfomolibdênico, o óleo volátil de *E. benthamii* revelou uma atividade antioxidante total superior àquela determinada para a rutina. Entretanto, pelo método do radical livre DPPH, foi observado um baixo potencial antioxidante. O óleo essencial de *E. benthamii* apresentou um efeito antimicrobiano frente às cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e de *Candida albicans*, por meio dos métodos de difusão em disco e difusão em meio sólido utilizando cavidades. No ensaio inseticida contra o *Pediculus humanus capitis*, o óleo volátil em estudo demonstrou uma atividade fumegante e uma ação repelente desses insetos. Considerando esses resultados, estudos adicionais podem ser recomendados, visando à utilização do óleo essencial de *E. benthamii* como matéria-prima pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, atividade inseticida, morfoanatomia foliar, óleo essencial.

## ABSTRACT

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage, a tree native to Australia, is widely used for reforestation in Southern Brazil due to its fast growth and remarkable cold tolerance. The aim of this work was to evaluate the leaf morpho-anatomy and to investigate the chemical composition and the antimicrobial, antioxidant and insecticidal activities of the essential oil from *E. benthamii*. The botanical material was collected during the fall and spring seasons at Embrapa Florestas, Colombo (Paraná, Brazil). According to usual light and scanning microtechniques, anomocytic stomata on both leaf surfaces from *E. benthamii*, absence of trichomes, heterogeneous and symmetrical mesophyll, midrib with a plain-convex shape, idioblasts with calcium oxalate prisms, secretory cavities with oil content and lenticel-like structures were observed. The phytochemical screening performed from the aqueous and hydroethanol extracts of dried leaves of *E. benthamii* revealed triterpenes/steroids, flavonoid glycosides, saponin glycosides, tannins, fixed acids, volatile acids, amino groups and leucoanthocyanidins. By hydrodistillation, yields of 1.13 and 1.38 % were obtained for the volatile oils of adults dried leaves from *E. benthamii* collected in the fall and spring, respectively. The major components of these essential oils were identified by GC/MS as:  $\alpha$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene, *p*-cymene, aromadendrene, globulol and terpin-4-ol. For phosphomolybdenum method, the volatile oil of *E. benthamii* showed a total antioxidant activity higher than that achieved for rutin. However, a low antioxidant potential was observed for DPPH method. The essential oil of *E. benthamii* performed an antimicrobial effect against Gram-positive, Gram-negative and *Candida albicans* strains using both methods of disk diffusion and diffusion in solid-medium by plate-cavities. In the insecticidal activity against *Pediculus humanus capitis*, the investigated volatile oil showed fumigant and repellent effects. Considering these results, further studies can be recommended, in order to use the essential oil of *E. benthamii* as raw material for the pharmaceutical industry.

Key words: antimicrobial activity, antioxidant activity, essential oil, insecticidal activity, leaf morpho-anatomy.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| FIGURA 01 - | ESTRUTURA QUÍMICA DO EUCALIPTOL OU 1,8-CINEOL.....  | 30 |
| FIGURA 02 - | ASPECTO GERAL DO HÁBITO DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....  | 34 |
| FIGURA 03 - | ASPECTO EXTERNO DA CASCA DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....   | 34 |
| FIGURA 04 - | ASPECTO DAS FOLHAS JOVENS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....  | 35 |
| FIGURA 05 - | COMPARAÇÃO DO TAMANHO DAS FOLHAS ADULTAS E JOVENS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....  | 35 |
| FIGURA 06 - | ASPECTO DAS FOLHAS ADULTAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....   | 36 |
| FIGURA 07 - | VISTA FRONTAL DA FOLHA ADULTA DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....  | 36 |
| FIGURA 08 - | ASPECTO DA INFLORESCÊNCIA DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....  | 37 |
| FIGURA 09 - | ASPECTO DO BOTÃO FLORAL DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE.....  | 37 |
| FIGURA 10 - | INTERIOR DA CAIXA DE ISOPOR UTILIZADA PARA O TRANSPORTE DOS ESPÉCIMES DE <i>Pediculus humanus capitis</i> .....   | 48 |
| FIGURA 11 - | ESQUEMA DO ENSAIO PARA A INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FUMEGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE.....  | 49 |
| FIGURA 12 - | ESQUEMA DO ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE.....   | 50 |
| FIGURA 13 - | SECÇÃO PARADÉRMICA DA FACE ADAXIAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> , DESTACANDO O CONTOURO POLIÉDRICO DAS CÉLULAS EPIDÉRMICAS E A PRESENÇA DE ESTÔMATOS (ES).....           | 56 |
| FIGURA 14 - | ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ADAXIAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> (MEV 200 X).....  | 56 |
| FIGURA 15 - | ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ADAXIAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> (MEV 700 X), EVIDENCIANDO CERA EPICUTICULAR (CE) E ESTÔMATO (ES).....                               | 57 |
| FIGURA 16 - | SECÇÃO PARADÉRMICA DA FACE ABAXIAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> , REVELANDO O CONTOURO POLIÉDRICO DAS CÉLULAS EPIDÉRMICAS, ESTÔMATOS (ES) E CAVIDADE SECRETORA (CS)..... | 57 |
| FIGURA 17 - | ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ABAXIAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> (MEV 200 X).....  | 58 |
| FIGURA 18 - | ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ABAXIAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> (MEV 1500 X), DETALHANDO O ASPECTO DE UM ESTÔMATO (ES) E DA CERA                                    |    |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
|             | EPICUTICULAR (CE).....   | 58 |
| FIGURA 19 - | SECÇÃO PARADÉRMICA DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> EVIDENCIANDO O SÚBER CICATRICIAL (SC).....  | 59 |
| FIGURA 20 - | SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> , EXPONDO O ASPECTO GERAL DO MESOFILO, COM DESTAQUE PARA CAVIDADE SECRETORA (CS), CUTÍCULA (CU), EPIDERME (EP), ESTÔMATO (ES), FEIXE VASCULAR (FV), PARÊNQUIMA ESPONJOSO (PS) E PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO (PP)..... | 59 |
| FIGURA 21 - | SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA MEDIANA DA FOLHA DE <i>E. benthamii</i> , INDICANDO BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), CAVIDADE SECRETORA (CS), CUTÍCULA (CU), EPIDERME (EP), PARÊNQUIMA ESPONJOSO (PS), PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO (PP) E SISTEMA VASCULAR (SV).....         | 60 |
| FIGURA 22 - | SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA MEDIANA DE <i>E. benthamii</i> , DESTACANDO A BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), FLOEMA (FL), XILEMA (XL), E A PRESENÇA DE IDIOBLASTOS COM CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR).....   | 60 |
| FIGURA 23 - | SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE <i>E. benthamii</i> , DEMONSTRANDO BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), CAVIDADES SECRETORAS (CS), EPIDERME (EP) E SISTEMA VASCULAR (SV).....   | 61 |
| FIGURA 24 - | SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE <i>E. benthamii</i> , DESTACANDO CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR) E XILEMA (XL).....  | 61 |
| FIGURA 25 - | CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DA COLETA DE OUTONO, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....  | 75 |
| FIGURA 26 - | CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-20 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DA COLETA DE OUTONO, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....   | 76 |
| FIGURA 27 - | CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DA COLETA DE OUTONO, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....  | 77 |
| FIGURA 28 - | CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DA COLETA DE PRIMAVERA, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....   | 78 |
| FIGURA 29 - | CROMATOGRAMA EXPANDIDO (3-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DA COLETA DE PRIMAVERA, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....  | 79 |
| FIGURA 30 - | CROMATOGRAMA EXPANDIDO (17-34 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DA COLETA DE PRIMAVERA, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....   | 80 |
| FIGURA 31 - | MÉDIA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO, FRENTE AOS PADRÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE RUTINA.....  | 81 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| FIGURA 32 - | CURVA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH, A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> .... | 82 |
| FIGURA 33 - | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO QUÍMICA DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH.....  | 84 |
| FIGURA 34 - | ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> , DEMONSTRANDO OS PIOLHOS EVITANDO A ZONA TRATADA (ZONA B).....                                       | 93 |
| FIGURA 35 - | ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUMEGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> .....   | 93 |



## LISTA DE TABELAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| TABELA 01 - | ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE SEGUNDO ENGLER (1964) MODIFICADO.....  | 31 |
| TABELA 02 - | ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE CONFORME CRONQUIST (1981).....   | 31 |
| TABELA 03 - | METABÓLITOS SECUNDÁRIOS INVESTIGADOS NA TRIAGEM FITOQUÍMICA PARA AS FOLHAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE, A PARTIR DAS FRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO E PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO, INDICANDO AS RESPECTIVAS REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO..... | 41 |
| TABELA 04 - | CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E RESÍDUO SECO DO EXTRATO AQUOSO, OBTIDO A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>E. benthamii</i> .....   | 62 |
| TABELA 05 - | CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E RESÍDUO SECO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, ELABORADO A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>E. benthamii</i> .....  | 62 |
| TABELA 06 - | METABÓLITOS VEGETAIS VERIFICADOS NO EXTRATO AQUOSO E NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>E. benthamii</i> .....   | 63 |
| TABELA 07 - | TEOR DE UMIDADE NAS FOLHAS DE <i>E. benthamii</i> E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO A PARTIR DO PROCESSO DE HIDRODESTILAÇÃO.....   | 68 |
| TABELA 08 - | ANÁLISES FÍSICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> , EXTRAÍDO DAS FOLHAS COLETADAS NO OUTONO.....   | 69 |
| TABELA 09 - | ANÁLISES FÍSICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> EXTRAÍDO DAS FOLHAS COLETADAS NA PRIMAVERA.....  | 69 |
| TABELA 10 - | COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> OBTIDA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS.....   | 71 |
| TABELA 11 - | RESULTADOS DE IC <sub>50</sub> PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> , FRENTE AOS PADRÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE RUTINA, A PARTIR DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH.....  | 83 |
| TABELA 12 - | MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, REFERENTES À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> , FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO CAVIDADES.....                            | 86 |
| TABELA 13 - | MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DECORRENTES DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> , FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO.....  | 87 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| TABELA 14 - | MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, REFERENTES À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> , FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO EMPREGANDO UM VOLUME DE 5 $\mu\text{L}$ .....                              | 87 |
| TABELA 15 - | MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, RELATIVOS À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DILUÍDO A 500 E 250 $\text{mg.mL}^{-1}$ , FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO.....                                | 88 |
| TABELA 16 - | MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, REFERENTES À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> DILUÍDO A 50, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , FRENTE A CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i> PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO..... | 89 |
| TABELA 17 - | ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. benthamii</i> CONTRA O <i>Pediculus humanus capitis</i> .....   | 92 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                  |   |
|------------------|---|
| AAR              | atividade antioxidante relativa   |
| Abs              | absorvância   |
| ATCC             | American Type Culture Collection  |
| °C               | graus Celsius   |
| $d_{20}^{20}$    | razão entre a densidade do óleo a 20 °C e da água purificada a 20 °C                        |
| DP               | desvio padrão   |
| DPPH             | radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila   |
| DSA              | Ágar Dextrose Sabouraud   |
| Embrapa          | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária   |
| ESALQ            | Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz  |
| et al.           | expressão latina abreviada <i>et alli</i> , (=e outros)                                     |
| FAA              | fixador de tecidos vegetais constituído de formol, ácido acético e álcool etílico           |
| IC <sub>50</sub> | concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH  |
| IR               | índice de repelência  |
| Juss.            | Jussieu   |
| L'Hér.           | L'Héritier  |
| KT <sub>50</sub> | tempo necessária para a inativação de 50% dos espécimes de <i>Pediculus humanus capitis</i> |
| m                | metro   |
| M                | molar   |
| MHA              | Ágar Mueller-Hinton   |
| min              | minuto  |
| mL               | mililitro   |
| Mo               | molibdênio  |
| NaOH             | hidróxido de sódio  |
| $n_D^{20}$       | índice de refração a 20 °C  |
| pH               | potencial hidrogeniônico  |
| UEPG             | Universidade Estadual de Ponta Grossa   |
| UFPR             | Universidade Federal do Paraná  |
| UR               | umidade relativa  |
| UV               | ultravioleta  |
| µg               | micrograma  |
| µL               | microlitro  |
| µm               | micrômetro  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | 16 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>  | 18 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL  | 18 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 18 |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>                                    | 19 |
| 3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.                                       | 19 |
| 3.2 GÊNERO <i>Eucalyptus</i> L'HÉR.                               | 20 |
| 3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS  | 22 |
| 3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS                     | 23 |
| 3.4.1 Atividade antimicrobiana                                    | 23 |
| 3.4.2 Atividade antioxidante                                      | 25 |
| 3.4.3 Atividade inseticida  | 26 |
| 3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS DO GÊNERO <i>Eucalyptus</i>                  | 27 |
| 3.5.1 Eucaliptol  | 30 |
| 3.6 <i>Eucalyptus benthamii</i> MAIDEN ET CABBAGE                 | 31 |
| 3.6.1 Enquadramento sistemático                                   | 31 |
| 3.6.2 Aspectos botânicos e estudos fitoquímicos                   | 32 |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                      | 38 |
| 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO                                 | 38 |
| 4.2 ESTUDOS BOTÂNICOS   | 38 |
| 4.3 ESTUDOS FITOQUÍMICOS  | 39 |
| 4.3.1 Marcha sistemática fitoquímica                              | 39 |
| 4.3.2 Extração e determinação quantitativa do óleo essencial      | 41 |
| 4.3.3 Determinação do teor de umidade                             | 42 |
| 4.3.4 Análises físicas  | 42 |
| 4.3.4.1 Determinação da densidade relativa                        | 42 |
| 4.3.4.2 Determinação do índice de refração                        | 42 |
| 4.3.4.3 Determinação da solubilidade em álcool etílico            | 42 |
| 4.3.5 Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas          | 43 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS                            | 43 |
| 4.4.1 Atividade antioxidante                                      | 43 |
| 4.4.1.1 Método do fosfomolibdênio                                 | 43 |
| 4.4.1.2 Método do DPPH  | 44 |
| 4.4.2 Atividade antimicrobiana                                    | 45 |
| 4.4.2.1 Difusão em meio sólido utilizando cavidades               | 46 |
| 4.4.2.2 Difusão em disco  | 46 |
| 4.4.3 Atividade biológica contra <i>Pediculus humanus capitis</i> | 47 |
| 4.4.3.1 Coleta, armazenamento e transporte dos piolhos            | 47 |
| 4.4.3.2 Ensaio para a avaliação da atividade fumegante            | 48 |
| 4.4.3.3 Ensaio para a avaliação da atividade repelente            | 49 |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                   | 51 |
| 5.1 ESTUDOS BOTÂNICOS   | 51 |
| 5.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS  | 62 |
| 5.2.1 Características organolépticas e resíduo seco               | 62 |
| 5.2.2 Marcha sistemática fitoquímica                              | 62 |
| 5.2.3 Extração e determinação quantitativa do óleo essencial      | 67 |
| 5.2.4. Determinação do teor de umidade                            | 69 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.2.5. Análises físicas.....  | 69  |
| 5.2.6 Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas .....          | 70  |
| 5.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....                             | 81  |
| 5.3.1 Atividade antioxidante.....                                       | 81  |
| 5.3.1.1 Método do fosfomolibdênio.....                                  | 81  |
| 5.3.1.2 Método do DPPH.....   | 82  |
| 5.3.2 Atividade antimicrobiana.....                                     | 85  |
| 5.3.3 Atividade biológica contra <i>Pediculus humanus capitis</i> ..... | 91  |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 96  |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 97  |
| <b>APÊNDICES</b> .....  | 110 |
| <b>ANEXO</b> .....  | 138 |

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os medicamentos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde, 11% são obtidos diretamente de plantas medicinais e uma quantidade ainda mais expressiva de fármacos sintéticos é oriunda de fonte natural (NIERO *et al.*, 2003). A contabilidade revela que o mercado mundial de produtos farmacêuticos mobiliza 320 bilhões de dólares por ano, sendo que 20 bilhões são gerados a partir de substâncias derivadas de taxa medicinais (ROBBERS; SPEEDLE; TYLER, 1997). Em 1996, dos oito bilhões de dólares faturados pela indústria farmacêutica brasileira, cerca de 30% foram decorrentes de medicamentos provenientes de espécies botânicas (GUERRA; NODARI, 2007).

Existem em todo o mundo entre 350.000 e 550.000 espécies vegetais. O Brasil detém a maior diversidade dessa taxa do planeta Terra, desfrutando de uma posição privilegiada em relação a outros países. No entanto, ainda são insuficientes as pesquisas nas áreas de química de produtos naturais e de anatomia vegetal. Estima-se que apenas 17% de toda a flora mundial tenham sido estudadas quanto ao seu emprego medicinal (FOGLIO *et al.*, 2006).

Além da aplicação das espécies vegetais na medicina popular, é importante mencionar que vários fármacos utilizados até o presente, tiveram a sua origem a partir da investigação de taxa botânicos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Dessa forma, cabe ressaltar que o estudo com plantas requer análises não apenas de aspectos fitoquímicos, mas abordagens a respeito de dados agrotecnológicos, microbiológicos, farmacológicos e biotecnológicos, visando ampliar as possibilidades de novos agentes terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006; DIXON, 2001; PHILLIPSON, 2001).

O gênero *Eucalyptus* L'Her. compreendem mais de 800 espécies (BROOKER, 2002), sendo que a maior parte dessas é originária do continente australiano e de ilhas adjacentes. No Brasil, espécies de *Eucalyptus* têm grande importância econômica, sendo extensivamente utilizadas como matéria-prima na construção civil e em indústrias de compensado e de papel (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005). Além da exploração da madeira, o óleo essencial é amplamente aproveitado. O óleo essencial de eucalipto tem sido empregado na fabricação de produtos farmacêuticos e de limpeza e nas indústrias de perfumaria (VITIL; BRITO, 2003).

Dos cinco milhões de hectares de florestas plantadas no Brasil, 64% desse total é representado por *Eucalyptus* spp. As florestas existentes na região Sul do país constituem 7% da produção nacional de madeira de eucalipto. No entanto, em virtude de algumas condições climáticas, as opções de plantio são limitadas a um pequeno número de representantes, que apresentam maior resistência ao frio (AGRONLINE, 2008).

Em razão de alguns taxa de *Eucalyptus* terem sua utilização relacionada especificamente à produção de madeira e à obtenção de celulose, estudos fitoquímicos e medicinais são mais escassos para essas espécies. Dessa forma, investigações complementares podem ampliar o uso desses representantes, inclusive como uma fonte paralela de recursos econômicos.

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage é uma das espécies mais empregadas para reflorestamentos no Sul do Brasil. Esse táxon vem ganhando notoriedade, em função da alta capacidade de rebrota e da resistência elevada ao frio, suportando temperaturas de até  $-6^{\circ}\text{C}$  na fase inicial de desenvolvimento (LIMA, 2009; HIGA, 1999). Em ensaios realizados com diferentes representantes de *Eucalyptus*, *E. benthamii* tem sido a espécie de crescimento mais acelerado (HIGA; CARVALHO, 1990). Estudos referentes à qualidade da madeira e do carvão de *E. benthamii* têm sido desenvolvidos (LIMA, 2009; NISGOSKI, MUÑIZ; KLOCK, 1998), sendo que, tanto a madeira quanto o seu carvão, apresentam características adequadas como insumos energéticos. Em estudos restritos envolvendo *E. benthamii*, como os realizados por Silva, Brito e Silva Júnior (2006), foi verificada a presença do hidrocarboneto terpênico  $\alpha$ -pineno, como constituinte majoritário do óleo essencial desse táxon. Esse terpeno tem sido relacionado à atividade antibacteriana (LEITE *et al.*, 2007) e inseticida (MERCK CD, 2001). Por conseguinte, abordagens de caráter anatômico e investigações fitoquímicas podem ser consideradas insuficientes e restritas, a partir de *E. benthamii*.

Nesse contexto, os resultados da presente pesquisa podem promover o incentivo para a realização de plantio coordenado da espécie *E. benthamii*, não só para a produção de madeira e para a extração de celulose ou fibra, mas visando o aproveitamento desse táxon também para propósitos medicinais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo o estudo morfoanatômico, a prospecção fitoquímica e a investigação de atividades biológicas a partir das folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar as folhas de *E. benthamii* durante os períodos de outono e de primavera;
- Realizar a avaliação morfoanatômica das folhas adultas de *E. benthamii*;
- Efetuar a prospecção fitoquímica dos grupos de metabólitos secundários presentes nas folhas de *E. benthamii*;
- Promover a extração e verificar o rendimento do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*;
- Realizar as análises físicas do óleo essencial de *E. benthamii*;
- Identificar e quantificar os compostos voláteis presentes no óleo essencial das folhas de *E. benthamii*;
- Determinar a atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*;
- Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*;
- Determinar a atividade biológica do óleo essencial das folhas de *E. benthamii* contra o *Pediculus humanus capitis*.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS.

A família Myrtaceae é pertencente à ordem Myrtales ou Myrtiflorae, sendo composta por, aproximadamente, 144 gêneros e de 3100 a 4600 espécies (SOBRAL, 2003). As Myrtaceae constituem uma das mais importantes famílias de Angiospermae ou Magnoliopsida do Brasil, constando de uma única tribo, Myrta, e de três subtribos Myrciina, Eugeniina e Myrtinae (CRUZ; KAPLAN, 2004). Essa família é considerada pantropical, com dois grandes centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorra em todos os continentes (JOLY, 1998).

No Brasil, é muito reconhecido o valor dessa família, pela abundância de espécies e pelo importante papel na fitossociologia das florestas do Sul e Sudeste do país (CRUZ; KAPLAN, 2004). Além disso, a família Myrtaceae representa um dos grupos predominantes do componente arbóreo da Floresta Atlântica, na qual mais de 50 taxa podem ocorrer sintopicamente (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Em levantamento realizado por Cruz e Kaplan (2004), cerca de 70% das espécies pertencentes à família Myrtaceae, pode ser empregada para fins medicinais, como distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas, sendo as folhas, as cascas e os frutos, os órgãos botânicos mais empregados desses taxa.

Além disso, diversos estudos contemporâneos têm respaldado o uso popular de espécimes dos diversos gêneros de Myrtaceae, por meio de diferentes investigações farmacognósticas, relacionadas aos aspectos botânicos, fitoquímicos e de atividades biológicas.

De acordo com Joly (1998), os taxa pertencentes a essa família são plantas lenhosas, arbóreas ou arbustivas. As folhas são inteiras, de disposição alterna ou oposta e, às vezes, oposta cruzada, apresentando pontuações e revelando estípulas muito pequenas. É frequente a presença de cauliflora. Em relação às flores, a ocorrência maior é as de coloração branca ou, às vezes, avermelhadas, sendo qualificadas como efêmeras, hermafroditas e com simetria radial. As flores, geralmente, são pentâmeras, mono ou diclamídeas, evidenciando muitas vezes um receptáculo bem desenvolvido. A corola pode ser suprimida e apresentar cálice gamossépalo com deiscência transversal. É comum a presença de numerosos estames. O ovário varia de súpero a semi-ífero, até ífero, podendo ser pentacarpelar e pentalocular, com muitos óvulos. O fruto é do tipo baciforme ou

capsular loculicida. As sementes podem apresentar poliembrionia e, também, podem ser do tipo aladas.

### 3.2 GÊNERO *Eucalyptus* L'HÉR.

A palavra *Eucalyptus* é derivada do grego *eu* (=bem) e *kalypto* (=cobrir) em referência ao opérculo que cobre as sementes até que estejam completamente desenvolvidas (GUENTHER, 1977).

A primeira descrição botânica do gênero *Eucalyptus* data de 1788 e foi realizada pelo botânico francês Charles-Louis L'Heritier de Brutelle (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005; ANDRADE; VECCHI, 1918), sendo que a primeira espécie encontrada foi, provavelmente, *Eucalyptus obliqua* L'Hér. *Eucalyptus globulus* Labill. foi descoberto na Tasmânia, por La Billardiére, em 1792. Nesse mesmo ano, La Billardiére identificou *Eucalyptus cornuta* Labill. e, mais tarde, em 1806, *Eucalyptus viminalis* Labill. e *Eucalyptus amygdalina* Labill. (ANDRADE; VECCHI, 1918). Somente em 1800 é que um pequeno número de espécies começou a ser descrito, sendo que grande parte desses taxa foram nominados por Joseph Smith (BROOKER, 2002).

De acordo com Moura (1980) apud Coutinho *et al.* (2004), o gênero *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil em 1825 por D. Pedro I. Os exemplares de *Eucalyptus robusta* Sm. e de *Eucalyptus tereticornis* Sm. foram plantados no Jardim Botânico da cidade do Rio de Janeiro. No entanto, para Andrade e Vecchi (1918), é difícil determinar com segurança a data de introdução do eucalipto no Brasil. Segundo esses autores, os primeiros eucaliptos podem ter sido introduzidos no Rio Grande do Sul, em 1868, por Frederico de Albuquerque. E, nesse mesmo ano, alguns representantes foram plantados na Quinta da Boa Vista, no Rio de Janeiro, pelo tenente Pereira da Cunha.

Em 1852, o célebre botânico alemão Barão Ferdinand Von Mueller foi administrar o Jardim Botânico de Melbourne, na Austrália. Esse botânico se dedicou ao estudo de numerosas espécies do gênero *Eucalyptus* durante quase meio século, e publicou, de 1879 a 1884, a obra "Eucalyptographia", considerado um trabalho gigantesco, com a descrição de 100 espécies (ANDRADE; VECCHI, 1918).

De acordo com Andrade e Vecchi (1918), outros dois importantes estudiosos desse gênero, naquela época, foram G. Bentham e J. H. Maiden. J. H. Maiden foi o

diretor do Jardim Botânico de Sidnei e estimado como um dos mais respeitado especialista em *Eucalyptus* spp.

Os eucaliptos são árvores originárias da Austrália, que também ocorrem naturalmente nas ilhas adjacentes. Porém, é possível encontrar espécies endêmicas em Papua-Nova Guiné. Além disso, algumas espécies ocorrem somente na parte oeste do arquipélago da Indonésia e, também, nas Filipinas (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005).

Não existem muitos dados relativos ao emprego dos eucaliptos pelos aborígenes australianos. Entretanto, informações etnobotânicas têm demonstrado que eles utilizavam não apenas as folhas, mas também, a resina e a casca, para a obtenção de decoctos destinados ao tratamento de disenteria e para lavarem feridas. A casca apresentava utilização como antisséptico (ALONSO, 1998).

As espécies do gênero *Eucalyptus* são capazes de se adaptar às mais distintas e severas condições de clima e temperatura, ocorrendo tanto em áreas tropicais, quanto em regiões de temperaturas mais baixas. Podem ocupar solos secos e úmidos. Alguns taxa, excepcionalmente, são tão resistentes, que suportam a exposição a fortes ventos, frio intenso e rigorosas nevascas (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962).

*Eucalyptus* compreende mais de 800 espécies, sendo que esse número continua aumentando à medida que novos taxa são descritos (BROOKER, 2002). As espécies são caracterizadas e classificadas por meio do tipo de inflorescência, botão floral e frutos (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005).

A introdução desse gênero em inúmeros países se deve ao fato de que o seu cultivo é fácil e que estão disponíveis uma ampla diversidade de cultivares, de acordo com o propósito do plantio (BROOKER, 2002). Além disso, essas espécies permitem um retorno econômico elevado, dentro de um breve período de tempo (SCHUMACHER; CALIL; VOGEL, 2005).

A determinação botânica dos eucaliptos é frequentemente uma tarefa difícil, pois uma única característica raramente é suficiente para esse propósito. Essa atividade, na maioria das vezes, é baseada no tamanho e na forma das árvores, na natureza da casca do tronco e caules jovens, nas características da folha adulta, incluindo a venação e a presença de estruturas contendo óleo, no formato das folhas jovens, no tipo de inflorescência e no tamanho, forma e estrutura dos botões florais e dos frutos. A ocorrência natural das espécies, a localização geográfica e o habitat

também podem ser de grande valia na identificação, uma vez que muitas espécies são estritamente limitadas na sua distribuição (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962).

Uma grande variedade de tipos de madeira pode ser produzida a partir dos eucaliptos. Considerando essa diversidade, os eucaliptos podem ser utilizados para as mais diferentes finalidades, como na produção de celulose e de papel, para a construção de mobiliário, postes, dormentes e mourões, bem como fonte de energia e na construção civil (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962).

### 3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, em função de suas propriedades físicas. Podem ser definidas de uma maneira geral, como misturas complexas de substâncias, geralmente, aromáticas, lipofílicas, voláteis e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2007). Ou ainda, como líquidos oleosos voláteis dotados de aroma fortes e provenientes do metabolismo secundário dos vegetais (PINHEIRO, 2003). De acordo com a Anvisa, os óleos essenciais podem ser caracterizados como:

[...] produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por desterpenados, aqueles que tenham sido submetidos a processo de desterpenação; e, por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados (BRASIL, 1999).

Os óleos voláteis são comumente encontrados em folhas, frutos e flores, mas podem estar estocados em outros órgãos vegetais (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007). Dependendo da família, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como células parenquimáticas diferenciadas, pêlos glandulares, canais oleíferos ou bolsas lisígenas, esquizógenas ou esquizolisígenas (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A obtenção dos óleos essenciais pode ser realizada por diversos processos, de acordo com a sua localização no órgão vegetal, com a quantidade e com o propósito de uso do mesmo. Os métodos mais comuns para a sua extração são: enfloração ou *enfleurage*; prensagem ou expressão; extração com solventes

orgânicos; extração por fluido supercrítico; destilação por arraste de vapor; e *headspace* (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos voláteis apresentam características físicas comuns, embora tenham composições químicas distintas. São parcialmente solúveis em água ou insolúveis, sendo, no entanto, solúveis em solvente orgânicos apolares, como o éter etílico (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; TYLER; BRADY; ROBBERS, 1988). Possuem sabor, geralmente, acre e picante e coloração incolor, ou discretamente amarelada, sendo poucos os óleos voláteis que apresentam cor. A maior parte dos óleos essenciais possui índice de refração específico e são opticamente ativos, sendo que essas propriedades podem ser empregadas na identificação e no controle da qualidade desses compostos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Com relação à composição química, os óleos etéreos são constituídos por compostos de baixa massa molar, sendo que a grande maioria é representada por combinações bastante variáveis de fenilpropanóides e de terpenóides, além de uma diversidade de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007). Além disso, a composição química e a concentração dos constituintes voláteis podem sofrer a influência de diversos fatores, como as condições edafoclimáticas, o processo de secagem do material botânico e o método de extração empregado (COSTA *et al.*, 2005; VITTI; BRITO, 1999).

Uma das principais funções biológicas exercida pelos óleos voláteis está relacionada à atração de polinizadores. No entanto, além dessa, há outras funções ecológicas, como a inibição da germinação, a proteção contra predadores e a proteção contra a perda de água e o aumento de temperatura (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A utilização dos óleos essenciais pelas empresas de perfumaria, de alimentos e farmacêutica é crescente, visto que esses compostos constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para esses segmentos industriais (PINHEIRO, 2003; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993).

### 3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

#### 3.4.1 Atividade antimicrobiana

Vários trabalhos têm sido realizados acerca da atividade antimicrobiana de óleos essenciais (CERMELLI *et al.*, 2008; BOSNIC; SOFTIC; VASIC, 2006;

DELAQUIS *et al.*, 2002; LIMBERGER *et al.*, 1998), sendo que a maioria desses estudos foi conduzida com os óleos voláteis sem fracionamento (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

Os métodos mais empregados para a avaliação dessa atividade biológica são os ensaios *in vitro*, realizados por difusão, diluição ou bioautografia. Contudo, devido a uma série de fatores que podem interferir no teste, a investigação da atividade antimicrobiana pode ser pouco reprodutível. Dentre esses aspectos, é possível destacar o método usado para a extração do óleo essencial, o volume de inóculo bacteriano, a fase de crescimento do microrganismo, o meio de cultura utilizado, o pH do meio de cultura e o tempo e a temperatura de incubação (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007). A análise dos resultados pode ser afetada ainda pelas particularidades que os óleos essenciais apresentam como a volatilidade, a complexidade na composição química e a insolubilidade em água, a qual pode impedir ou dificultar a difusão no meio de cultura (NASCIMENTO *et al.*, 2007; JANSSEN; SCHEFFER; SVENDSEN, 1987). O uso de solventes orgânicos e de emulsionantes também pode interferir no resultado da atividade antimicrobiana de um óleo essencial (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Para os fenilpropanóides carvacrol etil éter, cinamaldeído, eugenol, *p*-cimeno e timol, estudos revelaram uma ação antibacteriana frente a uma extensa variedade de microrganismos. Os terpenóides acetato de bornila, acetato de geranila,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, aromadendreno, carvona, citronelal, 1,8-cineol, geraniol, mentona, mirceno, nerol e terpin-4-ol também apresentaram uma relevante atividade antimicrobiana (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

A atividade biológica exercida pelos constituintes isolados dos óleos voláteis está relacionada com a estrutura química, com os grupos funcionais e com a estereoquímica dos compostos. Nesse contexto, é possível citar o caso dos terpenóides, em que, geralmente, a presença de um grupamento acetato acentua a atividade antibacteriana da substância (DORMAN; DEANS, 2000).

De acordo com Cowan (1999), o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana dos terpenóides não está completamente esclarecido. Há indícios de que os compostos terpênicos são capazes de promover o rompimento da membrana plasmática de microrganismos. No entanto, algumas pesquisas relativas à ação de terpenóides sobre a membrana bacteriana, têm revelado que essa atividade pode

ser devida à potência dos grupos funcionais, à propriedade lipofílica e ao grau de solubilidade em água (KNOBLOCH *et al.*, 1989).

### 3.4.2 Atividade antioxidante

Os radicais livres são moléculas com a deficiência de um elétron em sua camada mais externa, permanecendo com outro elétron desemparelhado, o que os tornam espécies altamente reativas (GUERRA FILHO; FANAM, 1994). A ação no organismo ocorre de forma cumulativa e em cadeia, sendo que um radical livre atua sobre uma determinada molécula retirando-lhe um elétron e fazendo com que esta substância se torne reativa e, dessa forma, seja passível de atacar outra molécula, e assim sucessivamente. Os agentes antioxidantes compreendem uma ampla variedade de compostos que assumem a função de intervenção, seja ao parar, ao retardar ou ao prevenir a oxidação de um substrato por radicais livres (VOEGELI *et al.*, 1992).

Os óleos essenciais com propriedades antioxidantes são amplamente aplicados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2007).

A determinação da atividade antioxidante de óleos essenciais pode trazer subsídios ao seu emprego terapêutico, uma vez que substâncias antirradicais desempenham um importante efeito protetor frente a diversos danos biológicos (MATSINGOU; KAPSOKEFALOU; SALIFOGLU, 2000).

A ação antioxidante dos óleos voláteis está relacionada com a sua composição química. Óleos essenciais ricos em compostos fenólicos, como carvacrol, eugenol e timol são, na maioria das vezes, mais ativos. Esse fato pode ser explicado pela presença de um grupamento doador de elétrons na posição *orto* em relação à hidroxila fenólica (TOMAINO *et al.*, 2005).

Em função da complexidade que alguns óleos etéreos apresentam, é desaconselhável a utilização de somente um método para a investigação da atividade antioxidante, o que pode conduzir a resultados falso-positivos ou falso-negativos. Também, quando se deseja determinar o mecanismo da atividade antioxidante, é necessária a utilização de mais de um procedimento experimental (DORMAN *et al.*, 2000).

### 3.4.3 Atividade inseticida

Atualmente, há um grande interesse na utilização de plantas medicinais e de seus respectivos extratos como uma alternativa aos inseticidas sintéticos. Nesse sentido, os óleos essenciais podem ser candidatos interessantes (TOLOZA *et al.*, 2008). Alguns deles, são seletivos, apresentam pouco ou nenhum efeito prejudicial sobre os demais organismos, comumente são produtos não tóxicos e revelam uma menor persistência no ambiente do que os inseticidas sintéticos (TOLOZA *et al.*, 2008; MUMCUOGLU *et al.*, 2002). Além disso, a aplicação repetida de inseticidas sintéticos convencionais, como os piretróides, usados para combater o *Pediculus humanus capitis*, conduzem ao surgimento de resistência (TOLOZA *et al.*, 2008; TOLOZA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2004). Dessa forma, os óleos voláteis e/ou os seus compostos isolados têm sido sugeridos como uma opção aos pediculicidas sintéticos frequentemente adotados no tratamento da pediculose.

O *Pediculus humanus capitis* De Geer é um ectoparasita conhecido popularmente como piolho-da-cabeça. É um inseto pequeno, de aproximadamente 3 mm de comprimento, sendo que tanto o macho, quanto a fêmea, são ápteros, com peças bucais modificadas para perfurar a pele e sugar o sangue (STORER *et al.*, 1998).

A infestação por piolhos é denominada de pediculose. Normalmente é verificada nas crianças em idade escolar, atingindo tanto países desenvolvidos, quanto países em desenvolvimento (TOLOZA *et al.*, 2006). A pediculose causa um prurido intenso, devido à saliva injetada pelos insetos durante a hematofagia, sintoma que leva o hospedeiro a arranhar o couro cabeludo, podendo ocasionar dermatite e infecções secundárias.

No Brasil, de acordo com Barbosa e Pinto (2003), a pediculose atinge cerca de 30% das crianças em fase escolar. Em Ponta Grossa, no estado do Paraná, a prevalência da pediculose em crianças de creches municipais foi estabelecida em 28,04% (DOROSO *et al.*, 2004).

Segundo Yang e colaboradores (2004), os compostos que possuem ação tanto sobre os ovos, quanto sobre a fase adulta do piolho-da-cabeça, incluem  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, benzaldeído, cinamaldeído, (*E*)-pinocarveol, eugenol,  $\gamma$ -terpineno, linalol, salicilaldeído e salicilato de metila.



### 3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS DO GÊNERO *Eucalyptus*

O início da produção industrial do óleo essencial de eucalipto ocorreu em 1860, na cidade de Victoria, Austrália. O precursor desse processo foi um imigrante inglês chamado Joseph Bosisto (ALONSO, 1998).

As propriedades medicinais e aromáticas dos eucaliptos têm sido, normalmente, associadas aos seus componentes voláteis, sendo que o número de compostos fixos é bem inferior ao número de substâncias voláteis. As folhas são, o órgão vegetal geralmente investigado, mas também, é possível isolar metabólitos secundários do caule (BROPHY; SOUTHWELL, 2002).

Os primeiros estudos sobre os óleos voláteis de eucalipto sugeriam que a composição do óleo essencial era fixa para a mesma espécie, sendo que muitos taxa foram, algumas vezes, estabelecidos apenas por meio de evidências químicas. No entanto, mais tarde, foi observado que variações na composição química intraespécie poderiam ocorrer (BROPHY; SOUTHWELL, 2002).

Dentre as espécies de *Eucalyptus*, cerca de 400 taxa fornecem óleos essenciais com diferentes características. No entanto, para fins terapêuticos são utilizadas espécies que contêm um teor elevado de cineol (acima de 70%) e um baixo teor de felandreno (até 5%) (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A maior parte do óleo volátil de eucalipto está presente nas folhas, sendo que é proveniente de pequenas cavidades globulares ou glândulas. Essas estruturas estão localizadas em todo o parênquima foliar e podem ser evidenciadas desde o início do desenvolvimento dos tecidos vegetais (VITTI; BRITO, 2003). Também, é possível observar a presença de óleo essencial nos caules (cascas e ramos terminais), nos botões florais e nos frutos de eucalipto. O óleo essencial, obtido a partir das folhas de eucalipto, é formado por uma complexa mistura de componentes orgânicos voláteis, muitas vezes envolvendo de 50 a 100 compostos, ou mais. As substâncias predominantes são os monoterpenos e os sesquiterpenos (VITTI; BRITO, 2003; FABROWSKI, 2002).

De acordo com Vitti e Brito (2003), *E. citriodora*, *E. globulus* e *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex F. M. Bailey são as principais espécies cultivadas no Brasil para a produção de óleo essencial. Relatam ainda que dentre o número de representantes de eucalipto existentes, pouco mais de 200 taxa foram estudados visando a obtenção e o teor de óleo volátil.

O uso de espécies de eucalipto para a produção de madeira e para a extração de óleo essencial tem aumentado, apesar da maioria das áreas cultivadas em solo brasileiro ainda ser destinada à produção de papel e de carvão. Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados, a fim de ampliar a aplicação de alguns taxa de eucalipto para a produção de óleo essencial. Silva, Brito e Silva Júnior (2006) analisaram o potencial de onze representantes de eucalipto existentes no Brasil para a produção de óleo volátil. Dentre as espécies ainda não empregadas comercialmente, *E. viminalis* revelou ser o táxon de maior potencial para a exploração da essência, considerando o teor elevado de 1,8-cineol.

A principal atividade farmacológica do eucalipto está centrada no seu óleo essencial e relacionada ao sistema respiratório. O óleo volátil de eucalipto tem demonstrado uma atividade expectorante, além de ser fluidificante e antisséptico da secreção dos brônquios, tanto pela via oral, quanto inalatória (SIMÕES; SPITZER, 2007). O efeito antisséptico também pode ser evidenciado no sistema urogenital e no trato digestivo, sendo que o eucaliptol é o componente mais ativo (ALONSO, 1998).

Outras aplicações da essência de eucalipto envolvem: a vaporização em saunas ou em banheiros, na perfumaria, em compressas quentes, na indústria de alimentos, na limpeza de materiais, em produtos desinfetantes e, até mesmo, na remoção de manchas de roupas (FABROWSKI, 2002).

Segundo Navarro *et al.* (1996), os usos populares para a espécie *E. globulus* estão relacionados a afonia, asma, bronquite, faringite, febre, gripe, resfriados, tosse e alguns ferimentos. A inalação de derivados de *Eucalyptus* tem sido usada no tratamento de faringite, bronquite e sinusite (CERMELLI *et al.*, 2008).

Algumas investigações têm demonstrado que o óleo volátil de determinadas espécies de *Eucalyptus* apresenta atividade antimicrobiana e/ou antifúngica. Pesquisas adicionais têm sido conduzidas com a finalidade de avaliar a atividade antiviral do óleo essencial de espécies desse gênero.

Em estudo realizado por Franco *et al.* (2005), foi verificado o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. Pelo método de difusão em disco, foi observado que a espécie em questão possui efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura.

A atividade antibacteriana de *E. globulus* tem sido mais pronunciada frente a microrganismos Gram-positivos, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e

*Micrococcus glutamiosus*. Em relação às bactérias Gram-negativas, o espectro tem sugerido uma menor ação antimicrobiana desse óleo essencial, sendo observada uma atividade somente contra o microrganismo *Escherichia coli*. O fungo *Candida albicans* também indicou sensibilidade ao óleo volátil dessa espécie (ALONSO, 1998).

Cermelli *et al.* (2008) investigaram a atividade antibacteriana e antiviral do óleo essencial de *E. globulus* frente a patógenos isolados de pacientes com infecções no aparelho respiratório. As bactérias *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram as mais sensíveis ao óleo essencial, seguidas do *Streptococcus pneumoniae*. Os resultados da atividade antiviral revelaram apenas um efeito discreto sobre os vírus responsáveis pela caxumba.

A maioria dos vegetais possui resistência a diferentes patógenos. Essa condição pode ser explicada pela presença de componentes fungistáticos produzidos, naturalmente, a partir do metabolismo bioquímico das espécies botânicas. Dentro desse contexto, estão sendo desenvolvidos estudos a respeito do efeito do óleo essencial de eucalipto sobre o crescimento micelar de alguns fungos fitopatógenos, presentes no solo ou em partes aéreas de plantas. Salgado *et al.* (2003) analisaram o potencial fungitóxico de óleos essenciais das folhas de eucaliptos, notadamente *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. urophylla*. Os óleos voláteis das três espécies revelaram uma inibição expressiva no crescimento micelial dos fitopatógenos *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* na concentração de 500 mg.kg<sup>-1</sup>. O óleo essencial de *E. camaldulensis* apresentou o maior efeito fungitóxico.

Os óleos voláteis de algumas espécies vegetais têm sido amplamente relatados como inseticidas (ISMAN, 1999). A partir dessas constatações, alguns trabalhos têm sido conduzidos com óleos essenciais de *Eucalyptus* spp., a fim de avaliar a atividade biológica contra o *Pediculus humanus capitis*. Em estudo realizado por Toloza *et al.* (2008), os óleos voláteis das espécies *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, e ainda os híbridos *E. grandis* x *E. camaldulensis* e *E. grandis* x *E. tereticornis*, apresentaram atividade fumegante e atividade repelente dos insetos, sendo que a hibridação interespecie potencializou essas ações. Os resultados dessa investigação também demonstraram a importância do 1,8-cineol na atividade fumegante do óleo essencial de eucalipto.

Os metabólitos secundários vegetais têm sido empregados como pesticidas ou como modelos para o desenvolvimento de pesticidas sintéticos. Os monoterpenos podem causar uma intervenção tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas dos insetos herbívoros (BRATTSTEN, 1998). Prates *et al.* (1998a) verificaram que o monoterpeno 1,8-cineol, componente do óleo essencial de capim-gordura (10,6%), foi capaz de exterminar as larvas do carrapato *Boophilus microplus* em 5 min. Esse efeito inseticida, atribuído ao 1,8-cineol, tem sido confirmado por diversos estudos (PRATES *et al.*, 1998b). Em pesquisa elaborada por Chagas *et al.* (2002), foi avaliada a ação biocida do óleo essencial e de concentrados emulsionáveis de *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* frente ao carrapato *Boophilus microplus*. Os resultados confirmaram que o 1,8-cineol, principal componente do *E. globulus*, foi o principal responsável pela ação acaricida.

### 3.5.1 Eucaliptol

O eucaliptol é o componente majoritário de alguns óleos essenciais de *Eucalyptus*, além de ser obtido por meio de outras fontes. O eucaliptol (Figura 01), 1,8-epoxi-*p*-mentano ou 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]-octano, também é conhecido como 1,8-cineol ou cajeputol. Esse composto apresenta a fórmula molecular  $C_{10}H_{18}O$  e massa molar igual a  $154,24 \text{ g.mol}^{-1}$ . É um monoterpeno constituído por duas subunidades isoprênicas. Apresenta-se na forma de um líquido límpido, incolor, de odor aromático, canforáceo característico, de sabor picante seguido da sensação de frescor (MERCK CD, 2001; FARMACOPÉIA Brasileira, 1959)

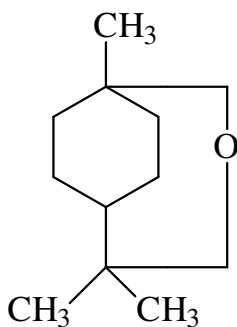


FIGURA 01 – ESTRUTURA QUÍMICA DO EUCALIPTOL OU 1,8-CINEOL

### 3.6 *Eucalyptus benthamii* MAIDEN et CABBAGE

#### 3.6.1 Enquadramento sistemático

As Tabelas 01 e 02 sumarizam o enquadramento botânico da espécie em estudo, considerando os sistemas de classificação propostos por Engler (1964) e por Cronquist (1981), respectivamente.

TABELA 01 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN et CABBAGE SEGUNDO ENGLER (1964) MODIFICADO

| Engler (1964) modificado |   |
|--------------------------|---|
| Reino                    | Plantae                                       |
| Divisão ou Filo          | Embryophyta siphonogama                       |
| Subdivisão               | Angiospermae                                  |
| Classe                   | Dicotyledoneae                                |
| Subclasse                | Archychlamydeae                               |
| Ordem                    | Myrtiflorae                                   |
| Subordem                 | Myrtineae                                     |
| Família                  | Myrtaceae Juss.                               |
| Gênero                   | <i>Eucalyptus</i> L'Hér.                      |
| Espécie                  | <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden et Cabbage |

TABELA 02 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN et CABBAGE CONFORME CRONQUIST (1981)

| Cronquist (1981) |   |
|------------------|---|
| Reino            | Plantae                                       |
| Divisão ou Filo  | Magnoliophyta                                 |
| Classe           | Magnoliopsida                                 |
| Subclasse        | Rosidae                                       |
| Ordem            | Myrtales                                      |
| Família          | Myrtaceae Juss.                               |
| Gênero           | <i>Eucalyptus</i> L'Hér.                      |
| Espécie          | <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden et Cabbage |

### 3.6.2 Aspectos botânicos e estudos fitoquímicos

A espécie *E. benthamii* é uma árvore considerada moderadamente alta (Figura 02), atingindo aproximadamente 35 m de altura. É originária da Austrália, mais especificamente da região de Camden. Tem uma distribuição limitada na costa leste de Nova Gales do Sul, sendo que a maior ocorrência é verificada no sudoeste de Sidney, nas planícies do Rio Nepean e de seus afluentes (NISGOSKI, MUÑIZ; KLOCK, 1998).

No continente australiano, espécimes de *E. benthamii* florescem, principalmente, de abril a maio. Porém, botões florais podem ser encontrados durante o ano inteiro, com exceção do mês de fevereiro. Durante os meses de abril a junho e de outubro a dezembro, frutos maduros podem ser colhidos. No entanto, o florescimento e a frutificação podem variar consideravelmente entre os indivíduos da espécie (PRYOR, 1981).

*E. benthamii* é conhecido, popularmente, como *camden white gum* e apresenta bom desenvolvimento em planícies de rios ou ladeiras brandas (NISGOSKI, MUÑIZ; KLOCK, 1998).

Na África do Sul, essa árvore é considerada promissora para o plantio em regiões com geadas frequentes e foi incluída no programa de melhoramento do ICFR (*Institute for Commercial Forestry Research*), a partir de 1994 (HIGA; PEREIRA, 2003).

Na China, *E. benthamii* também tem apontado um bom desenvolvimento na província de Yunnan, apesar do seu crescimento ter sido afetado um pouco pelo déficit hídrico (HIGA; PEREIRA, 2003).

No Brasil, esse táxon tem ganhado notoriedade, em função da alta capacidade de rebrota e da resistência elevada ao frio, suportando temperaturas de até  $-6^{\circ}\text{C}$  na fase inicial de desenvolvimento (LIMA, 2009; HIGA, 1999).

Na região Sul, mais especificamente no estado de Santa Catarina, *E. benthamii* tem revelado tolerância às geadas e um crescimento adequado em cultivos experimentais com dois e três anos. No estado de Minas Gerais, essa espécie tem demonstrado um potencial para as áreas montanhosas (HIGA, 1999).

Em ensaios realizados com diferentes representantes de *Eucalyptus*, *E. benthamii* tem sido a espécie de desenvolvimento mais acelerado do gênero (HIGA; CARVALHO, 1990).

Os resultados referentes à qualidade da madeira sugerem o uso potencial de *E. benthamii* para lenha e carvão e como fonte de celulose (JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002). Porém, o emprego da sua madeira em serraria não é adequado, pois apresenta empenamentos e rachaduras durante a etapa de secagem (HIGA; PEREIRA, 2003). Outros trabalhos consideram a madeira dessa espécie como moderadamente dura, sendo passível de uso em locais protegidos (NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 1998).

A espécie *E. benthamii* tem a seguinte descrição botânica:

A casca persistente (Figura 03) é fina, compacta e tende a formar pequenas tiras longitudinais, as quais são aderentes apenas em parte. Folhas senis opostas, sésseis, os primeiros dois a quatro pares elípticos a ovais; glândulas proeminentes, espalhadas na folha e conspícuas no pecíolo. Folhas jovens (Figuras 04 e 05) opostas, sésseis, largamente oblongo-ovadas a ovadas, subglaucas, de textura moderadamente fina. Folhas intermediárias opostas a subopostas, sésseis ou com pequena haste, lanceoladas; verdes, textura moderadamente fina. Folhas adultas (Figura 05 a 07) alternas, longas hastes, lanceoladas; verdes, algumas com textura fina. Inflorescência (Figura 08) axilar, 4-7 flores, pedúnculos com 0,5 cm de comprimento, pedicelos com 0,25 cm. Botão floral (Figura 09) oval a clavado, no sul forma opérculos hemisféricos e subglaucos, no norte apresenta forma cônica e dificilmente glauco. Fruto hemisférico a campanulado, subglauco quando imaturo; disco estreito, levemente convexo ou mais ou menos iguais, 3-4 valvas (Nisgoski; Muñiz; Klock, 1998, p. 69).

Em estudo desenvolvido para verificar o potencial para a obtenção de óleo essencial, a partir de onze espécies de eucalipto, foram observados valores de rendimento de 0,40 e 0,35% de óleo volátil nas folhas frescas de *E. benthamii*, colhidas nos meses de outono e de verão, respectivamente. Por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, o  $\alpha$ -pineno foi caracterizado como o constituinte majoritário do óleo volátil de *E. benthamii*. A partir do material foliar coletado nos meses de outono, inverno, primavera e verão, respectivamente, foram encontrados concentrações de 47,6; 26,4; 24,2 e 34,7% de  $\alpha$ -pineno no óleo essencial da espécie em questão (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006).



FIGURA 02 – ASPECTO GERAL DO HÁBITO DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE,  
MYRTACEAE

FONTE: O autor (2008)



FIGURA 03 – ASPECTO EXTERNO DA CASCA DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE,  
MYRTACEAE

FONTE: O autor (2008)





FIGURA 04 – ASPECTO DAS FOLHAS JOVENS DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE  
FONTE: O autor (2009)



FIGURA 05 – COMPARAÇÃO DO TAMANHO DAS FOLHAS ADULTAS E JOVENS DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE  
FONTE: O autor (2009)



FIGURA 06 – ASPECTO DAS FOLHAS ADULTAS DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE  
FONTE: O autor (2009)



FIGURA 07 – VISTA FRONTAL DA FOLHA ADULTA DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE  
FONTE: O autor (2009)





FIGURA 08 – ASPECTO DA INFLORESCÊNCIA DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE  
FONTE: Tomoe Nakashima (2009)



FIGURA 09 – ASPECTO DO BOTÃO FLORAL DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CABBAGE, MYRTACEAE  
FONTE: O autor (2008)

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), no município de Colombo, na região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Colombo está localizado a 915,14 m de altitude, 25°17'30" S de latitude e 49°13'27" W de longitude.

As folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage, a partir do quarto nó, foram coletadas durante o outono e a primavera de 2008.

As exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica (UPCB), do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o número 59440, sendo a determinação botânica realizada pelo taxonomista Olavo Guimarães, e no Museu Botânico Municipal, sob o número 350231, a partir da determinação botânica do taxonomista Osmar dos Santos Ribas.

### 4.2 ESTUDOS BOTÂNICOS

A fixação das folhas para a obtenção das lâminas semipermanentes e permanentes foi realizada utilizando-se FAA 70 (JOHANSEN, 1940), sendo o material, posteriormente, armazenado em álcool etílico a 70% (V/V).

Para a montagem das lâminas semipermanentes foi usado o método de Berlyn e Miksche (1976). Foram realizadas secções transversais da porção mediana do limbo foliar, bem como secções paradérmicas da face adaxial e da face abaxial das folhas da espécie em estudo. As secções foram feitas à mão livre. Para a coloração, foi utilizado o azul de toluidina a 0,05% (m/V) (HADDAD, 1989) e a fucsina básica a 0,0125% (m/V) mais o azul de astra a 1% (m/V) (BRITO; ALQUINI, 1996). A montagem das lâminas foi desenvolvida com glicerina a 50% (V/V) em água purificada, seguindo a lutagem com esmalte de unha incolor.

Para a elaboração das lâminas permanentes, o material foi desidratado em série etanólica crescente e diafanizado em xilol. A infiltração foi realizada em estufa a 60 °C, com parafina (JOHANSEN, 1940). As secções transversais da porção central e mediana do limbo foliar e do pecíolo foram obtidas a partir dos blocos parafinados, em micrótomo de rotação Leica RM 2025, com 10 e 12 µm de espessura. As secções foram hidratadas, distendidas nas lâminas e secas em mesa térmica a 40 °C. Para a coloração, foi empregada a solução de azul de toluidina a

0,05% (m/V) (SAKAI, 1973) e também, a solução de fucsina básica 0,0125% (m/V) mais azul de astra a 0,5% (m/V) (LUQUE *et al.*, 1996; ROESER, 1972). O bálsamo do Canadá sintético foi usado como meio de montagem.

Para a avaliação histoquímica, foram feitas secções transversais à mão livre da região mediana de folhas recentemente coletadas de *E. benthamii*. Essas secções foram tratadas com os seguintes reagentes: cloreto férrico, para a comprovação de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); lugol, indicado para a pesquisa de amido (BERLYN; MIKSHE, 1976); floroglucinol acidificado, para evidenciar a presença de lignina (FOSTER, 1949); e Sudam III, para a investigação de substâncias graxas, como estruturas de revestimento cutinizadas e suberizadas e gotículas de óleo (SASS, 1951).

Os registros fotográficos foram conduzidos no Fotomicroscópio Olympus CX31, sendo que as escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

Para a análise ultra-estrutural da superfície adaxial e da superfície abaxial da lâmina foliar, as amostras foram fixadas em FAA 70 e desidratadas em série etanólica crescente (SOUZA, 1998). Após a montagem em suporte metálico, os fragmentos da região mediana das folhas foram submetidos à metalização com ouro em aparelho Shimadzu IC-50. As eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SSX-550 *Superscan* (15 kV). O registro das imagens ocorreu pela utilização de software específico.

#### 4.3. ESTUDOS FITOQUÍMICOS

##### 4.3.1 Marcha sistemática fitoquímica

A marcha sistemática fitoquímica foi realizada segundo Schenkel; Gosmann e Athayde (2007), Harborne (1998); Evans (1989); Moreira (1979) e Farnsworth (1966). A partir das folhas de *E. benthamii*, dessecadas em temperatura ambiente por 30 dias, foi elaborado o extrato aquoso (20 g da droga vegetal em água purificada *q.s.p.* 100 mL) e, também o extrato hidroalcoólico, na mesma concentração, empregando, porém, o álcool etílico a 70% (V/V) como líquido extrator. Para isso, foi adotado o método de maceração simples, com agitação manual ocasional e aquecimento em banho-maria a 50 °C.

De acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988), foi determinado o resíduo seco do extrato aquoso e do extrato hidroalcoólico. Após a

avaliação das características organolépticas de cor, odor e sabor, e da determinação potenciométrica do pH, foi desenvolvida a pesquisa dos metabólitos secundários vegetais presentes em *E. benthamii*.

No extrato aquoso, foi investigada a presença de aminogrupos, glicosídeos antociânicos, glicosídeos cianogênicos, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, ácidos voláteis, ácidos fixos e glicosídeos saponínicos. No extrato hidroalcoólico, foi pesquisada a presença de glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas, taninos e glicosídeos saponínicos.

A Tabela 03 sumariza as reações conduzidas para o extrato aquoso e para o extrato hidroalcoólico, visando a caracterização dos metabólitos secundários na espécie em estudo.

TABELA 03 – METABÓLITOS SECUNDÁRIOS INVESTIGADOS NA TRIAGEM FITOQUÍMICA PARA AS FOLHAS DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CAMBAGE, A PARTIR DAS FRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO E PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO, INDICANDO AS RESPECTIVAS REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO

| METABÓLITO SECUNDÁRIO    | ENSAIO(S)   | REFERÊNCIA(S)  |
|--------------------------|---|--|
| Ácidos Fixos             | Reação com reativo de Nessler   | Moreira (1979);  |
| Alcalóides               | Reação de Bertrand<br>Reação de Bouchardat<br>Reação de Dragendorff<br>Reação de Mayer  | Evans (1989);<br>Moreira (1979)                          |
| Aminogrupos              | Reação de ninhidrina  | Moreira (1979);  |
| Antraquinonas            | Reação de Bornträger  | Evans (1989)   |
| Cumarinas                | Método de UV utilizando ninhidrina  | Harborne (1998)  |
| Glicosídeos antociânicos | Reação de coloração em meio ácido, básico e neutro  | Moreira (1979)   |
| Glicosídeos cianogênicos | Reação com papel picro-sódico   | Moreira (1979)   |
| Glicosídeos flavônicos   | Reação de Shinoda<br>Reação oxalo-bórica<br>Reação de Pacheco<br>Reação com zinco   | Moreira (1979);<br>Farnsworth (1966)                     |
| Glicosídeos saponínicos  | Teste de formação de espuma   | Schenkel; Gosmann e<br>Athayde (2004);<br>Moreira (1979) |
| Taninos                  | Reação com sais de Ferro III<br>Reação com cloridrato de emetina<br>Reação com gelatina a 2,5%<br>Reação com sulfato de ferro amoniacal<br>Reação com cianeto de potássio<br>Reação com ácido nitroso<br>Reação com formol clorídrico | Santos; Mello (2004);<br>Harborne (1998)                 |
| Triterpenos/esteróides   | Reação de Liebermann-Burchard   | Moreira (1979);<br>Farnsworth (1966)                     |

#### 4.3.2 Extração e determinação quantitativa do óleo essencial

O óleo essencial de 100 g de folhas estabilizadas de *E. benthamii* foi determinado quantitativamente por meio de hidrodestilação, utilizando o aparato de Clevenger (USP XXVIII, 2005). A extração foi conduzida por 6 h para as amostras de outono e de primavera. Após esse tempo, foi verificada a quantidade de óleo

essencial extraído pela medida do volume no tubo graduado, em triplicata. O material obtido foi estocado em tubos *Eppendorf*, em temperatura de  $4 \pm 0,5$  °C.

#### 4.3.3 Determinação do teor de umidade

O método selecionado para a avaliação da umidade das folhas dessecadas de *E. benthamii*, as quais foram utilizadas para a extração do óleo essencial, foi o ensaio gravimétrico de perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 2000). Para a realização desse procedimento, uma massa conhecida de aproximadamente 3 g do material cortado, não excedendo 3 mm para cada aresta e desconsiderando a espessura, foi colocada em estufa a 105 °C, até que duas pesagens consecutivas não indicassem uma diferença maior do que 5 mg. O ensaio foi efetuado em triplicata.

#### 4.3.4 Análises Físicas

A partir dos óleos essenciais, provenientes das folhas de *E. benthamii* coletadas no outono e na primavera, foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros físico-químicos: densidade relativa, índice de refração e solubilidade em etanol.

##### 4.3.4.1 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa ( $d_{20}^{20}$ ) foi determinada por picnometria conforme o indicado na Farmacopéia Brasileira (1988), considerando a massa da amostra líquida de óleo essencial e a massa da água purificada, ambas a 20 °C.

##### 4.3.4.2 Determinação do índice de refração

Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), o índice de refração de uma substância ( $n_D^{20}$ ) é a relação entre a velocidade da luz no ar ou no vácuo e a velocidade da luz na substância. Esse ensaio foi efetuado em refratômetro modelo RL3 (PZ0- Warszawa).

##### 4.3.4.3 Determinação da solubilidade em álcool etílico

A solubilidade do óleo essencial foi determinada em álcool etílico a 70% (V/V), 80% (V/V), 90% (V/V) e em álcool etílico absoluto (PHARMACOPEA Helvetica, 1990). O álcool etílico foi colocado na bureta de 25,00 mL, e gotejado



sobre a amostra de 100  $\mu\text{L}$  do óleo essencial de *E. benthamii*. Após a solubilização total da amostra, foi realizada a leitura do volume gasto de álcool na bureta, em décimos de mililitros, estabelecendo-se a relação de solubilidade.

#### 4.3.5 Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas

A identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial da espécie em estudo foi realizada por meio do cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 6890, equipado com o detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975, em coluna de capilaridade HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). A temperatura do injetor foi de 220 °C, sendo a da coluna de 60 °C, com rampa de aquecimento de 3 °C.min<sup>-1</sup>, temperatura final de 240 °C e temperatura do auxiliar de 250 °C. O hélio foi usado como gás de arraste, a 1 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras de óleo essencial foram solubilizadas em acetato de etila para as análises. O volume injetado foi de 1,0  $\mu\text{L}$ . Os componentes dos óleos essenciais foram identificados pela comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007) e com os espectros da biblioteca NIST-05.

### 4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 4.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial, proveniente das folhas de *E. benthamii* coletadas no outono, foi determinada por dois métodos: o método do fosfomolibdênio e o método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).

##### 4.4.1.1 Método do fosfomolibdênio

O método de redução do complexo fosfomolibdênico para a determinação da capacidade antioxidante total (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), é baseado na redução do molibdênio VI a V pela amostra em análise. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente, em triplicata, a 695 nm.

Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  da amostra, em solução etanólica a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi acrescentada em um tubo de ensaio, juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio a 4 mmol.L<sup>-1</sup>, fosfato de sódio 28 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido sulfúrico 0,6 mol.L<sup>-1</sup>). O tubo foi fechado hermeticamente e levado ao banho-maria a 95 °C por 90 min.

O tubo foi resfriado e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 695 nm contra um branco (300  $\mu\text{L}$  de etanol, acrescidos de 3 mL

do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e a rutina a  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, conforme a Equação 01.

$$\% \text{AA} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{AA}} - \text{Abs}_{\text{branco}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.4.1.2 Método do DPPH

O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, cuja solução possui uma coloração violeta, com absorção máxima no comprimento de onda de 517 nm (ARNAO, 2000; BLOIS, 1958). Na medida em que o radical livre DPPH vai sendo reduzido por uma substância antioxidante, ocorre o emparelhamento de seu elétron e a absorvidade nesse comprimento de onda reduz (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995).

Inicialmente, foi determinada a cinética da reação, a fim de verificar o tempo necessário para a máxima redução do DPPH. O tempo, a partir do qual duas medidas de absorvância consecutivas revelaram valores muito próximos, foi adotado como adequado aos ensaios de determinação da concentração inibitória ou  $\text{IC}_{50}$  (*inhibitory concentration*). O valor de  $\text{IC}_{50}$  corresponde à quantidade necessária de substância antioxidante para reduzir em 50% a concentração inicial da solução de DPPH.

##### a) Determinação do $\text{IC}_{50}$ do óleo essencial

Foram preparadas diferentes soluções etanólicas do óleo essencial, em concentrações variando de 600 a  $8000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A 3 mL de cada solução de óleo essencial, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH a  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Para o controle negativo, foi utilizado 3 mL de etanol e 100  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH. Após 30 min, foi efetuada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 517 nm. O aparelho foi zerado com álcool etílico absoluto.

Para cada concentração em estudo, foi calculada a porcentagem de atividade antioxidante (% AA), conforme a Equação 02.

$$\% AA = 100 - \left( \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Com os valores obtidos foi construído um gráfico da porcentagem de atividade antioxidante em função da concentração do óleo essencial, em  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ .

Para o cálculo do  $IC_{50}$ , foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50%, para a obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da concentração de DPPH adotada.

b) Determinação do  $IC_{50}$  do padrão de ácido ascórbico

Considerando a absorvidade molar, foram elaboradas soluções de ácido ascórbico (AA), em concentrações entre 0,078 e 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em etanol. A partir de cada 3 mL de solução, foi aplicado o mesmo procedimento estabelecido para as soluções etanólicas do óleo essencial de *E. benthamii*, possibilitando o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (Equação 02) para cada concentração, bem como o valor da concentração de AA com capacidade de reduzir 50% de 100  $\mu\text{L}$  de DPPH a 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  ( $IC_{50}$ ).

c) Determinação do  $IC_{50}$  do padrão de rutina

Foram preparadas soluções etanólicas de rutina, nas concentrações de 0,625 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O procedimento foi o mesmo relatado para a determinação do  $IC_{50}$  para a amostra do óleo essencial de *E. benthamii*.

#### 4.4.2 Atividade antimicrobiana

A avaliação antimicrobiana foi conduzida com os microrganismos: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615).

Cada inóculo microbiano foi preparado em soro fisiológico, padronizado pelo tubo 0,5 da Escala McFarland, em espectrofotômetro a 580 nm, o qual corresponde a aproximadamente  $10^6$  UFC/mL.

Os bioensaios foram realizados em Ágar Mueller-Hinton (MHA) e Ágar Dextrose Sabouraud (DSA) para bactérias e fungos, respectivamente. Para o

controle de esterilidade, os meios MHA e DAS, sem inoculação, foram incubados em estufa a  $36 \pm 2$  °C por 24 a 48 h, antes do início do experimento.

A capacidade antibacteriana e/ou antifúngica do óleo essencial da espécie em estudo foi desenvolvida por meio dos métodos de difusão em meio sólido utilizando cavidades (CLEELAND; SQUIRES, 1991) e de difusão em disco (KONEMAN *et al.*, 1997; BAUER *et al.*, 1966). O óleo essencial foi testado puro e nas concentrações de 500 mg.mL<sup>-1</sup>, 250 mg.mL<sup>-1</sup>, 500 µg.mL<sup>-1</sup>, 100 µg.mL<sup>-1</sup> e 50 µg.mL<sup>-1</sup>, em água purificada, com a utilização de até 10% (m/V) de polissorbato 80. Todos os testes foram efetuados em triplicata, considerando a média das leituras como o resultado final.

#### 4.4.2.1 Difusão em meio sólido utilizando cavidades

Em capela de fluxo laminar, 1 mL da suspensão previamente preparada de cada microrganismo foi depositado em placas de Petri estéreis (15 x 90 mm), nas quais foram, posteriormente, adicionados 20 mL do meio de cultura fundido. As placas de Petri foram tampadas e homogeneizadas por movimentos circulares.

Com o auxílio de cânulas de vidro estéreis, foram feitas cavidades de 6 mm de diâmetro, perfurando o meio de cultura sólido. As cavidades foram inoculadas com 50 µL do óleo essencial e respectivas diluições. O cloranfenicol (30 µg.50 µL<sup>-1</sup>) e a gentamicina (30 µg.50 µL<sup>-1</sup>) foram empregados como controle positivo para as bactérias, enquanto que o cetoconazol (50 µg.50 µL<sup>-1</sup>) foi usado para a levedura.

As placas de Petri foram incubadas a  $36 \pm 2$  °C, sem inversão, durante 24 a 48 h. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi considerada positiva quando a média dos halos de inibição foi igual ou superior a 8 mm de diâmetro (LIMA; GUERRA; SILVA, 2000).

#### 4.4.2.2 Difusão em disco

Com o auxílio de uma micropipeta, foi efetuada a impregnação de 20 µL e 5 µL do óleo essencial de *E. benthamii*, e respectivas diluições, nos discos de papel de filtro previamente estéreis, sendo que um disco sem impregnação foi utilizado como controle de esterilidade.

Foi realizada a semeadura dos inóculos bacterianos previamente padronizados nas placas contendo os meios MHA e DSA, com o auxílio de um swab e de forma homogênea.

Utilizando uma pinça estéril, os discos impregnados, foram distribuídos sobre os meios de cultura. Os discos contendo cloranfenicol (30 µg), gentamicina (30 µg) e cetoconazol (50 µg) foram usados como controle positivo.

Após 30 min, as placas de Petri foram incubadas invertidas, em estufa a  $36 \pm 2$  °C por 24 a 48 h. A mensuração do halo de inibição do crescimento bacteriano foi realizada com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, segundo a USP XXVIII (2005). Os halos com diâmetro igual ou superior a 8 mm foram considerados como resultados positivos (LIMA; GUERRA; SILVA, 2000).

#### 4.4.3 Atividade biológica contra *Pediculus humanus capitis*

Este ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP/UEPG) em 12 de maio de 2009, sob o número 3167/09.

##### 4.4.3.1 Coleta, armazenamento e transporte dos piolhos

Após os esclarecimentos sobre a finalidade do trabalho e sobre o procedimento a ser adotado, a coleta dos exemplares de *Pediculus humanus capitis* foi realizada pelo método de catação manual, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo indivíduo voluntário ou pelo seu responsável, quando menor de idade. Os piolhos coletados foram, imediatamente, transferidos para um recipiente de plástico cristal, rígido, com capacidade para 100 mL, acomodados junto a alguns fios de cabelos dos próprios voluntários, que serviram como suporte para os insetos. Para o transporte ao laboratório de Parasitologia Humana da UEPG, o frasco foi tamponado com gaze de algodão, identificado e acondicionado em caixa de isopor tampada (Figura 10), contendo termo-higrômetro de bulbo seco e bulbo úmido. A temperatura da caixa fechada foi mantida entre 25 e 30 °C e a umidade relativa (UR) entre 70 e 75%. O transporte ocorreu em um prazo máximo de 2 h. Após a constatação da mobilidade dos espécimes de *Pediculus humanus capitis*, esses insetos em diferentes fases evolutivas (ninfas e adultos) foram separados em grupos de seis e transferidos, com auxílio de uma pinça entomológica, para placas de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro.



FIGURA 10 – INTERIOR DA CAIXA DE ISOPOR UTILIZADA PARA O TRANSPORTE DOS ESPÉCIMES DE *Pediculus humanus capitis*

FONTE: O autor (2009)

#### 4.4.3.2 Ensaio para a avaliação da atividade fumegante

Foi utilizado o método proposto por Toloza *et al.* (2006) para investigar a atividade fumegante do óleo essencial de *E. benthamii*. Esse experimento foi conduzido em um sistema de câmara, utilizando uma placa de Petri e sua respectiva tampa (Figura 11), que permitiu a formação de vapores. Uma gota (60  $\mu\text{L}$ ) do óleo essencial em estudo foi depositada sobre a lamínula de vidro. Três grupos de seis piolhos adultos foram expostos ao teste com o óleo essencial, e monitorados a cada 5 min durante 1 h. Os resultados foram expressos como tempo médio de *knock-down* ( $\text{KT}_{50}$ ), em min. O *knock-down* consiste na incapacidade dos insetos se moverem em um papel filtro. O  $\text{KT}_{50}$  representa o tempo médio em que 50% dos piolhos foram imobilizados. Esse teste foi realizado em triplicata. Durante todo o procedimento, foram mantidos valores de temperatura de  $28 \pm 1$  °C e UR  $60 \pm 5\%$ . O controle negativo foi estabelecido da mesma forma, porém sem a aplicação de nenhuma substância sobre a lamínula de vidro. Como controle positivo, foi utilizado o óleo essencial de *Melaleuca* (Via Farma).

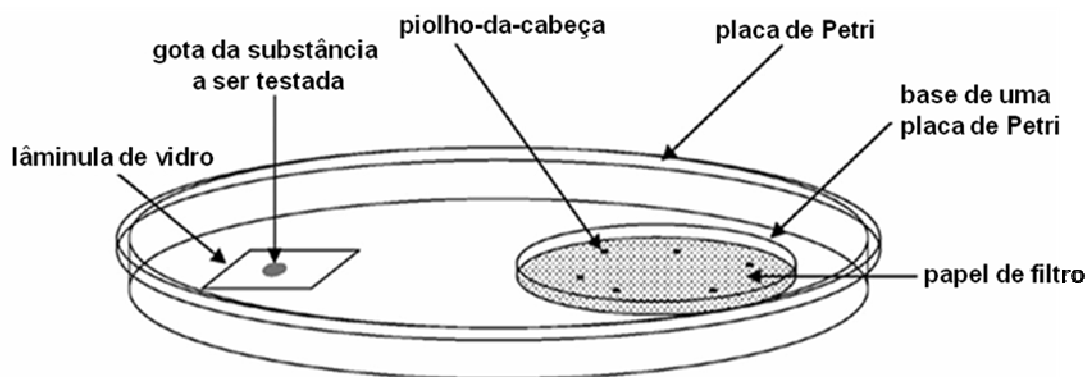


FIGURA 11 – ESQUEMA DO ENSAIO PARA A INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FUMEGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CAMBAGE  
 FONTE: adaptado de TOLOZA *et al.* (2006)

#### 4.4.3.3 Ensaio para a avaliação da atividade repelente

O teste de repelência, conforme o preconizado por Toloza *et al.* (2006), foi conduzido em um papel filtro, o qual foi dividido em duas zonas circulares: uma interna (zona a) e outra externa (zona b) (Figura 12). A zona b foi impregnada com 500  $\mu\text{L}$  do óleo essencial de *E. benthamii* em solução de acetona ( $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), enquanto a zona interna foi impregnada somente com acetona. Um teste preliminar foi efetuado, no qual ambas as zonas foram tratadas somente com acetona, sendo mensurada a mobilidade dos insetos em direção a zona externa (controle negativo). Grupos de seis piolhos adultos foram colocados na zona interna e a repelência foi expressa pela porcentagem de insetos que evitou a zona externa (zona impregnada com o óleo essencial em estudo). O experimento foi monitorado durante 1 h e a cada 5 min foi verificado o número de piolhos encontrados em cada zona. Como controle positivo foi utilizado o óleo essencial de citronela (DEG). Os testes foram efetuados em triplicata. O índice de repelência (IR) foi calculado como a porcentagem de insetos repelidos da zona tratada com o óleo essencial, a partir da Equação 03, na qual  $N_c$  é a média do número de piolhos encontrados na zona b do ensaio realizado somente com acetona (controle negativo) e  $N_t$  é o número de piolhos encontrados na zona b para o teste ou para o controle positivo.

$$RI = \left[ \left( \frac{N_c - N_t}{N_c} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

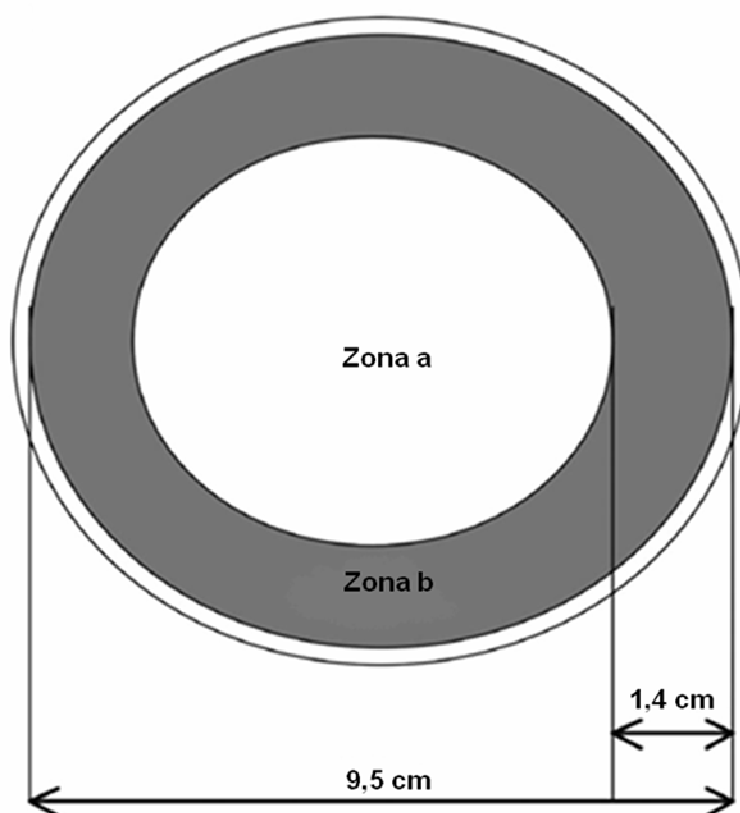


FIGURA 12 – ESQUEMA DO ENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CAMBAGE  
FONTE: adaptado de TOLOZA *et al.* (2006)



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDOS BOTÂNICOS

As folhas adultas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage revelaram disposição alterna e formato lanceolado, o que condiz com os aspectos morfológicos descritos na literatura (NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 1998).

Em vista frontal, as folhas de *E. benthamii* revelaram estômatos na face adaxial (Figuras 13 a 15) e na face abaxial (Figura 16 a 18), e sem a presença de tricomas. Os estômatos foram classificados como do tipo anomocíticos. As secções paradérmicas de ambas as faces mostraram paredes anticlinais de formato poliédrico (Figuras 13 e 16). A cutícula apresentou uma ornamentação característica, com aspecto ondulado e sinuoso (Figuras 15 e 18). A cera epicuticular demonstrou finas estriações (Figuras 15 e 18). Além disso, foi evidenciada a presença de estruturas concêntricas e lignificadas, características do gênero *Eucalyptus*, conhecidas como súber cicatricial (Figura 19).

A análise fotônica das secções transversais da lâmina foliar de *E. benthamii*, permitiu observar que os estômatos anomocíticos localizavam-se no mesmo nível das células epidérmicas (Figura 20). A presença de células epidérmicas uniestratificadas (Figuras 20 e 21), recobertas por uma cutícula lenticular comparativamente mais delgada, foi visualizada em ambas as faces. O mesofilo (Figuras 20 e 21) foi classificado como heterogêneo simétrico isobilateral, sendo composto por parênquima clorofiliano paliçádico e parênquima clorofiliano esponjoso. O parênquima clorofiliano paliçádico apresentou células dispostas de um a três estratos junto à face adaxial e à face abaxial. No parênquima clorofiliano esponjoso, foram visualizados de um a quatro estratos celulares. Feixes vasculares colaterais de médio e de pequeno porte foram notados na região mediana do mesofilo. Células idioblásticas, contendo cristais de oxalato de cálcio, foram verificadas nas proximidades dos feixes vasculares. Ainda no mesofilo, foram evidenciadas cavidades secretoras, com conteúdo de caráter lipofílico, direcionadas à epiderme de forma indistinta.

A nervura mediana (Figura 21) demonstrou contorno plano-convexo. As células epidérmicas uniestratificadas foram guarnecidas por cutícula de aspecto lenticular e de espessamento mais delgado que o das células epidérmicas. As regiões de colênquima e parênquima cortical revelaram aspecto inconspícuo. A bainha esclerênquimática apresentou (Figura 22) aspecto bem pronunciado, sendo

composta de três a cinco estratos celulares, circundando a região mediana de forma descontínua. O sistema vascular foi classificado como do tipo bicolateral em arco aberto. Em algumas secções, foram notados feixes vasculares acessórios, do tipo colateral, com tendência a bicolateralidade. O parênquima foi composto por células aproximadamente isodiamétricas, em vista transversal, sendo que também foram verificados, nessa região, idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio (Figura 22).

Em secção transversal, a região mediana do pecíolo (Figura 23) apresentou a superfície adaxial convexa e a abaxial reta, assumindo um formato plano-convexo. A epiderme dessa região foi descrita como uniestratificada, com cutícula de características semelhantes às observadas nas outras regiões da lâmina foliar. Foram verificadas, subjacentemente à epiderme, uma a duas camadas de células idioblásticas descontínuas e de conteúdo lipofílico. Na sequência, foi possível constatar a presença de quatro a seis camadas de colênquima do tipo angular. A região de parênquima, constituído por seis a oito camadas de células aproximadamente isodiamétricas, expôs também células contendo grânulos de amido e alguns idioblastos com cristais de oxalato de cálcio (Figura 24). As cavidades secretoras, de características idênticas às evidenciadas no mesofilo, foram visualizadas próximas a epiderme, o que tornou restrita a área de colênquima e de parênquima. Ao redor do sistema vascular, foi observada uma bainha esclerenquimática (Figura 23) composta por feixes de fibras congregadas de forma descontínua. O sistema vascular foi classificado como bicolateral em arco aberto, sem a presença de parênquima medular. Algumas secções de pecíolo apresentaram dois feixes vasculares acessórios e de menor tamanho, imediatos ao feixe vascular central e direcionados à região proximal da folha. Não foram verificados canais secretores adjacentes ao sistema vascular.

Por meio dos testes histoquímicos foi constatada a ocorrência de lignina na região de xilema e de bainha esclerenquimática, células idioblásticas contendo compostos fenólicos e grânulos de amido, cutícula composta por substâncias graxas e cavidades secretoras contendo substâncias de natureza lipofílica.

Espécies ricas em óleos voláteis são abundantes entre as Magnoliopsida (dicotiledôneas de Angiospermae), como Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae e Rutaceae (PAULA *et al.*, 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007). Particularmente, os representantes do gênero *Eucalyptus*, bem

como os demais gêneros da família Myrtaceae, apresentam folhas com pontuações, em função da presença de glândulas oleíferas ou cavidades secretoras (JOLY, 1998). Da mesma forma, a espécie *E. benthamii* apresentou quantidade considerável dessas cavidades secretoras distribuídas, sobretudo próximas a epiderme, o que restringiu as áreas de colênquima e parênquima fundamental localizadas no pecíolo e na nervura mediana. Johnson (1926) verificou a presença de elevado número de cavidades secretoras no *Eucalyptus globulus* Labill., as quais quase sempre apresentavam conteúdo oleífero. Para Metcalfe e Chalk (1950), a presença de cavidades secretoras é uma característica típica da família Myrtaceae, sendo que essas são, geralmente, de origem esquizolisígenas.

A morfologia da cutícula e da cera epicuticular é especialmente útil para o gênero *Eucalyptus*, permitindo a classificação desse gênero taxonomicamente complexo (WILKINSON, 1979). A espécie *Eucalyptus polyanthemos* Schauer apresenta, na maior parte de sua lâmina foliar, cera epicutilar na forma de placas ou escamas, no entanto, próximo à nervura principal foi verificada uma ornamentação do tipo tubular (WILKINSON, 1979). De modo particular, na espécie *E. benthamii* foi demonstrado um aspecto de cutícula ondulada e sinuosa nas duas faces, com a presença de finas estriações, quando da avaliação da cera epicuticular.

Os estômatos apresentados por *E. benthamii* foram classificados como anomocíticos, distribuídos em ambas as faces da lâmina foliar. A família Myrtaceae geralmente revela estômatos anomocíticos ou paracíticos, localizados tanto na face abaxial, quanto na face adaxial das folhas (METCALFE; CHALK, 1950; SOLEREDER, 1908). Alves, Tresmondi e Longui (2008) encontraram estômatos paracíticos na anatomia foliar da espécie *Eugenia uniflora* L., enquanto que para a espécie *Eugenia brasiliensis* Lam., foram visualizados estômatos do tipo anomocíticos (DONATO; MORRETES, 2007). Dessa forma, o tipo de estômato encontrado em *E. benthamii* concorda com as descrições para algumas espécies de Myrtaceae, as quais indicaram estômatos anomocíticos.

Segundo Metcalfe e Chalk (1950), o mesofilo das Myrtaceae são frequentemente isobilaterais. Espécies de *Eucalyptus* e *Eugenia* L., que possuem folhas em posições verticais e horizontais, podem algumas vezes exibir estrutura isobilateral no início, mas com tendência a se tornarem dorsiventrais no decorrer de seu desenvolvimento. A partir da análise da secção transversal da lâmina foliar da espécie *Psidium cattleianum* Sabine, Baptista da Silva (2002) verificou um arranjo

dorsiventral para o mesofilo. Em estudo da anatomia foliar de *Eugenia umbelliflora* O. Berg também foi verificada estrutura dorsiventral (MEDEIROS, 2000). Do mesmo modo, o mesofilo da espécie *Eugenia dysenterica* DC. apresentou composição dorsiventral, sendo constituído por dois estratos de parênquima paliçádico e sete estratos de parênquima esponjoso (PALHARES, 2003). Com relação à organização anatômica do mesofilo de folhas adultas de *E. benthamii*, foi possível constatar um arranjo heterogêneo simétrico, do tipo isobilateral, diferentemente do encontrado em alguns estudos farmacognósticos para a família Myrtaceae.

Como característica típica para a espécie *E. benthamii*, foi observada a presença do súber cicatricial. Essa formação, que compõem a lâmina foliar, está presente em alguns taxa de *Eucalyptus*, sendo revelada como pequenas áreas escuras, salientes, formadas de células suberosas para evitar a perda de água e de outras substâncias voláteis, como ocorre para *Eucalyptus globulus* Labill. (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Dessa forma, esse detalhe morfoanatômico tem elevada importância e pode ser considerado um aspecto diferencial na diagnose de *E. benthamii* frente a outros exemplares de Myrtaceae.

Tuffi-Santos e colaboradores (2008), ao descreverem a anatomia foliar de sete espécies de *Eucalyptus*, verificaram feixes vasculares do tipo bicolateral na nervura mediana. Entretanto, a disposição vascular foi diferenciada para os taxa avaliados, sendo em arco aberto para *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Eucalyptus pellita* F. Muell., *Eucalyptus pilularis* Sm. e *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. *Eucalyptus resinifera* Smith in J. White e *Eucalyptus saligna* Sm. apresentaram o mesmo arranjo de vascularização em arco, porém com terminações invaginadas. Para a nervura mediana de *Eucalyptus pyrocarpa* L. A. S. Johnson & Blaxell, os pesquisadores observaram sistema vascular do tipo sifonostélico. Nessa mesma pesquisa, também foram evidenciados cristais próximos a região de feixes vasculares para as sete espécies investigadas. A secção transversal de *E. benthamii* demonstrou sistema vascular em arco aberto com feixes do tipo bicolaterais, características que concordam com os dados encontrados para alguns taxa de *Eucalyptus*. A região de nervura mediana das folhas de *E. benthamii* também revelou cristais de oxalato de cálcio nas regiões de parênquima, sendo que no estudo realizado por Tuffi-Santos e colaboradores (2008), a presença de cristais na área de vascularização foi uma característica comum àquelas espécies estudadas.

De acordo com Cronquist (1981) e Metcalfe e Chalk (1950), o pecíolo das Myrtaceae apresenta sistema vascular bicolateral. Na pesquisa farmacognóstica de *E. dysenterica* foi evidenciado que o pecíolo está caracterizado por um feixe vascular bicolateral aberto e arqueado, sendo o arco com extremidades dirigidas para o centro (PALHARES, 2003). Medeiros (2000) igualmente observou feixes vasculares bicolaterais no pecíolo da espécie *E. umbelliflora*. Paula *et al.* (2008) constataram que os feixes vasculares no pecíolo de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum estão organizados na forma de arco, do tipo bicolateral. O arranjo vascular verificado no táxon desse estudo é do tipo bicolateral em arco aberto e sem a presença de parênquima medular, corroborando com as evidências encontradas na literatura para o pecíolo de espécies de Myrtaceae.

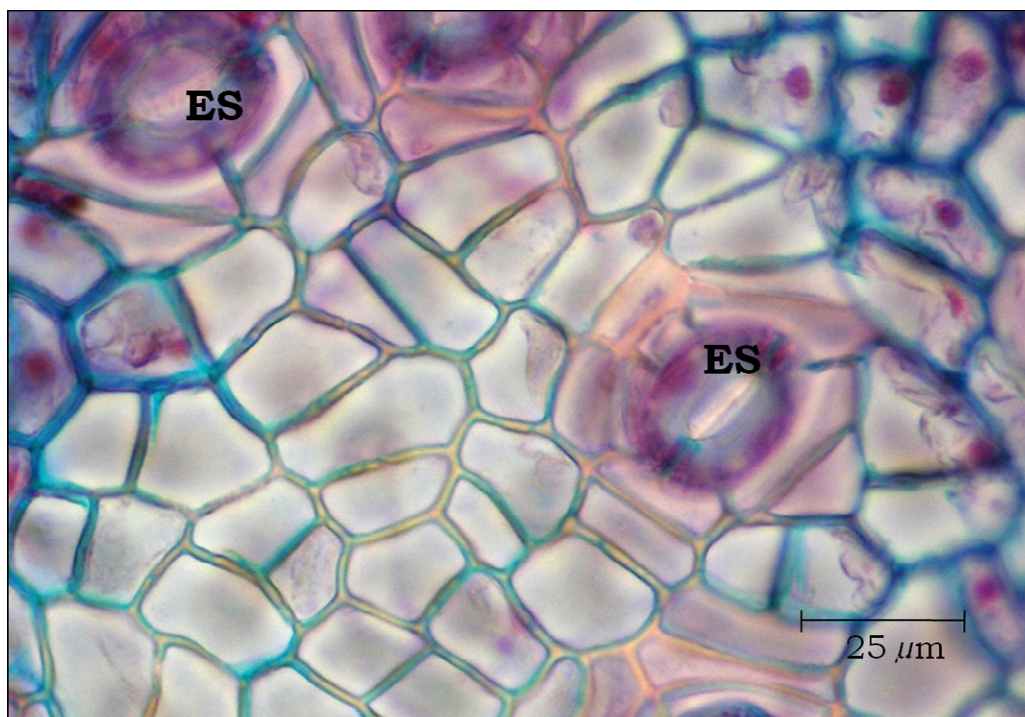


FIGURA 13 – SECÇÃO PARADÉRMICA DA FACE ADAXIAL DA FOLHA DE *E. benthamii*, DESTACANDO O CONTOPO POLIÉDRICO DAS CÉLULAS EPIDÉRMICAS E A PRESENÇA DE ESTÔMATOS (ES)

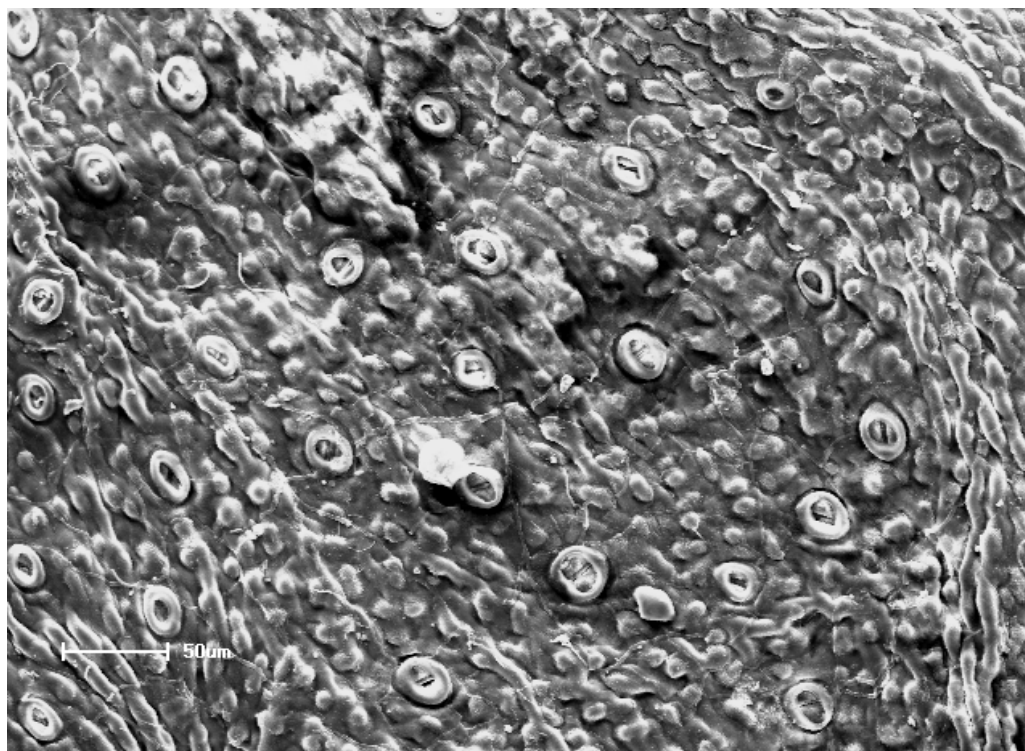


FIGURA 14 – ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ADAXIAL DA FOLHA DE *E. benthamii* (MEV 200 X)



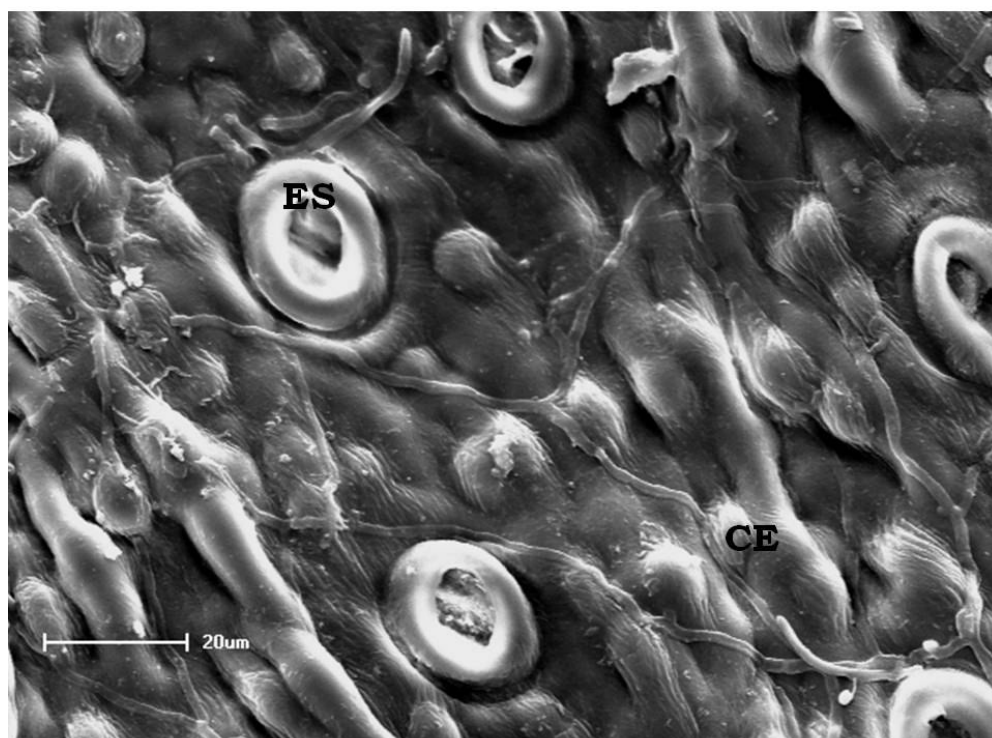


FIGURA 15 – ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ADAXIAL DA FOLHA DE *E. benthamii* (MEV 700 X), EVIDENCIANDO CERA EPICUTICULAR (CE) E ESTÔMATO (ES)

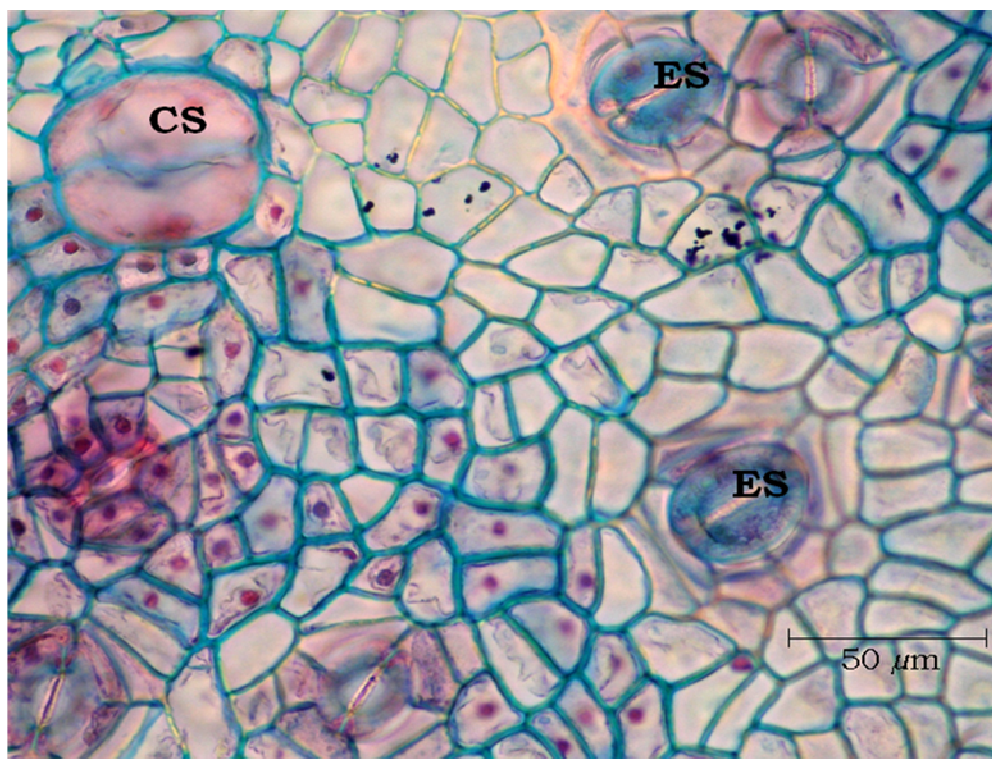


FIGURA 16 – SECÇÃO PARADÉRMICA DA FACE ABAXIAL DA FOLHA DE *E. benthamii*, REVELANDO O CONTOPO POLIÉDRICO DAS CÉLULAS EPIDÉRMICAS, ESTÔMATOS (ES) E CAVIDADE SECRETORA (CS)

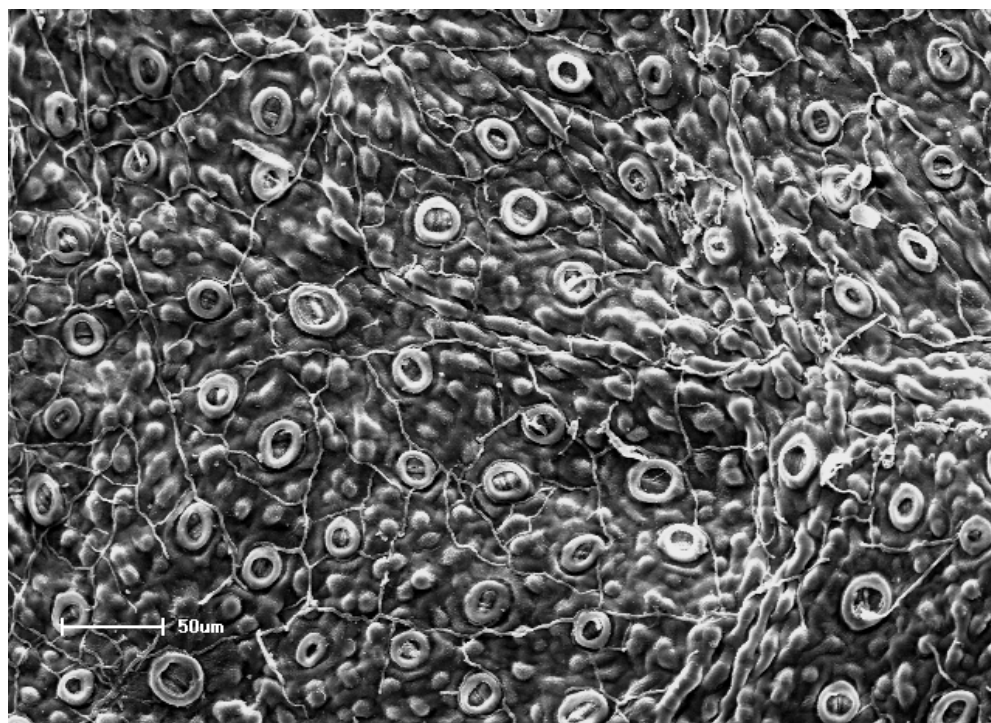


FIGURA 17 – ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ABAXIAL DA FOLHA DE *E. benthamii* (MEV 200 X)

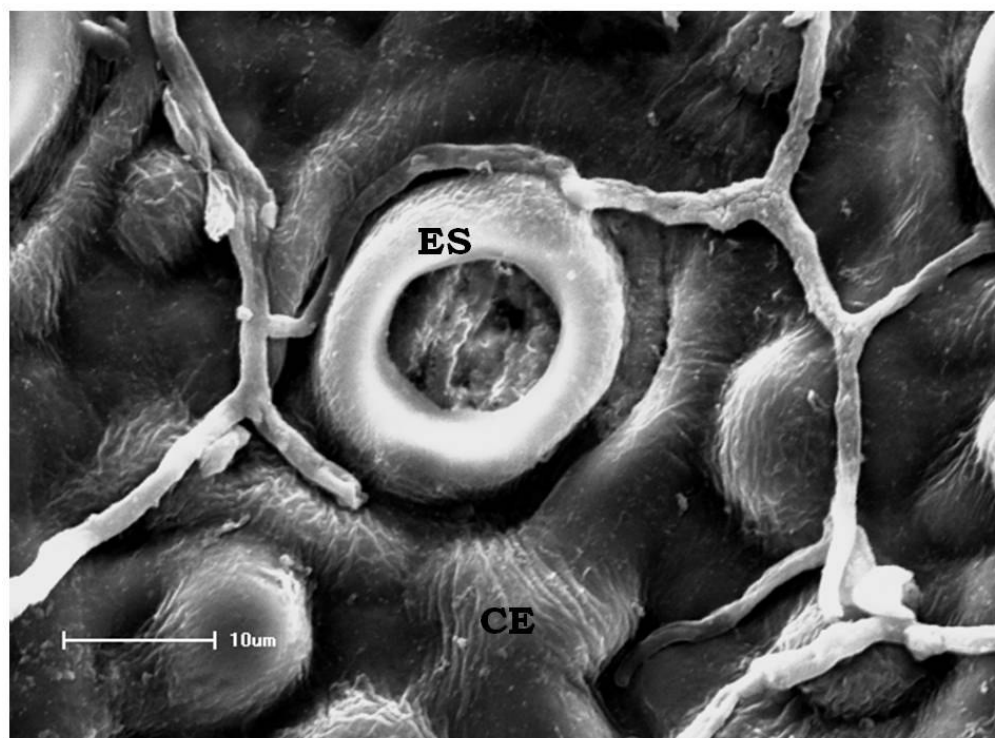


FIGURA 18 – ELETROMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ABAXIAL DA FOLHA DE *E. benthamii* (MEV 1500 X), DETALHANDO O ASPECTO DE UM ESTÔMATO (ES) E DA CERA EPICUTICULAR (CE)



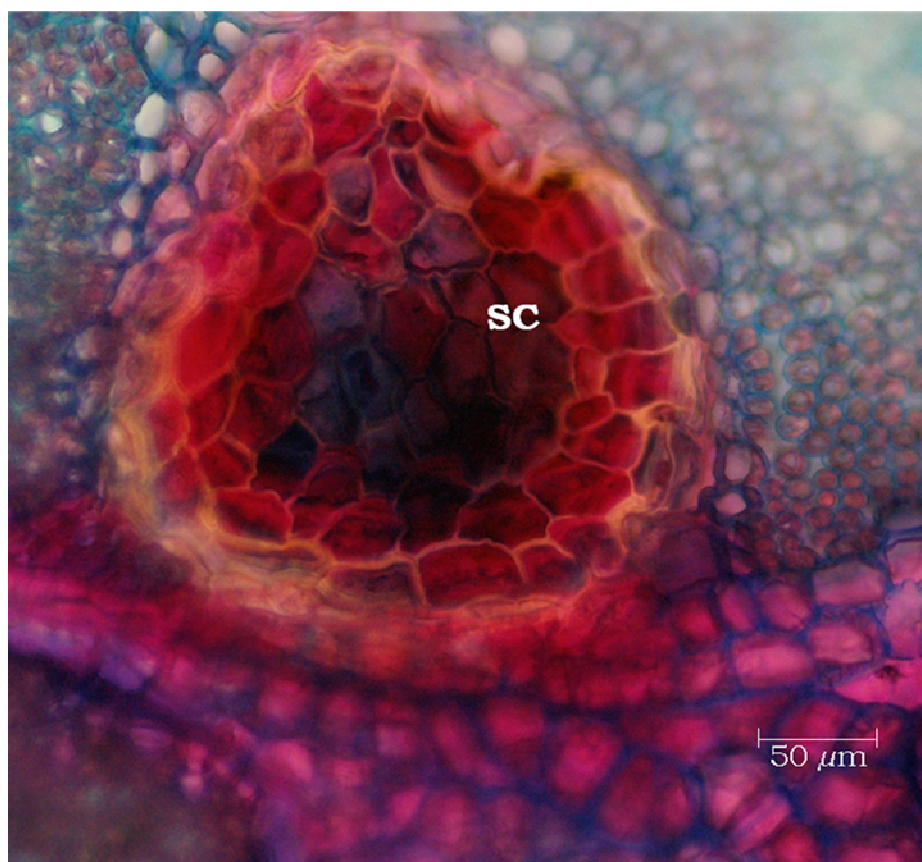


FIGURA 19 – SECÇÃO PARADÉRMICA DA FOLHA DE *E. benthamii* EVIDENCIANDO O SÚBER CICATRICIAL (SC)

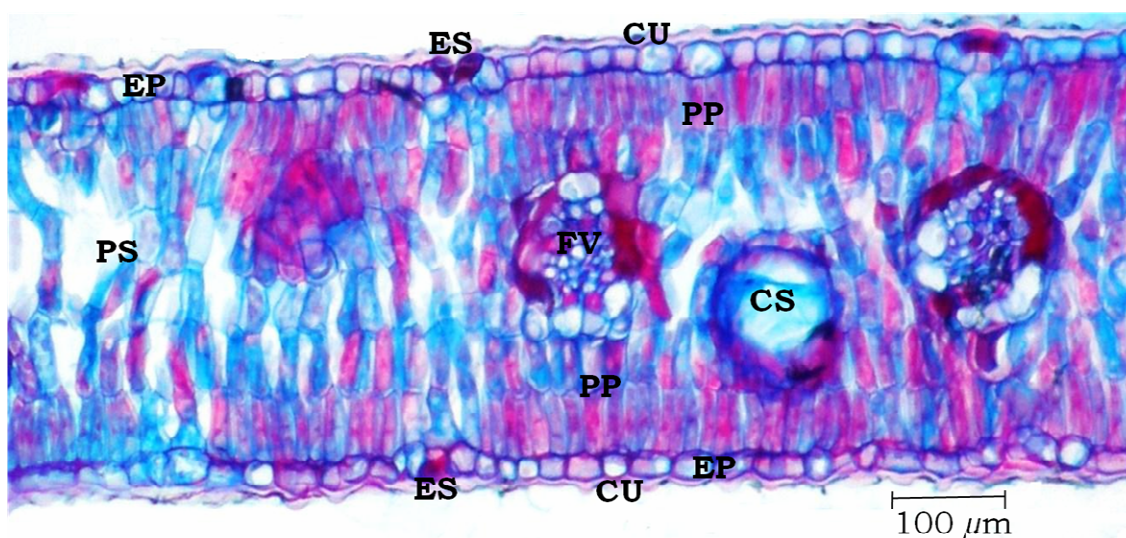


FIGURA 20 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA DE *E. benthamii*, EXPONDO O ASPECTO GERAL DO MESOFILO, COM DESTAQUE PARA CAVIDADE SECRETORA (CS), CUTÍCULA (CU), EPIDERME (EP), ESTÔMATO (ES), FEIXE VASCULAR (FV), PARÊNQUIMA ESPONJOSO (PS) E PARÊNQUIMA PALIÇADICO (PP)

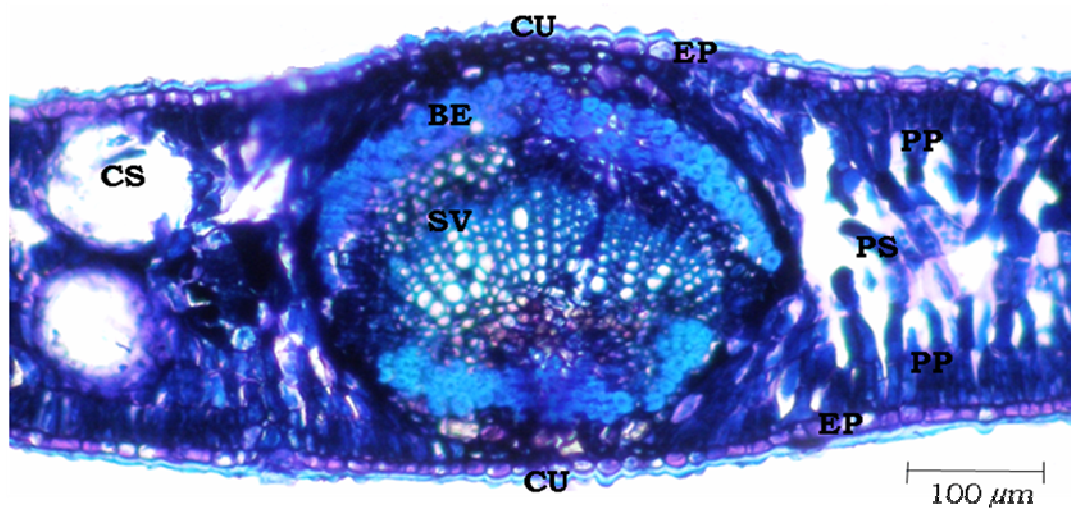


FIGURA 21 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA MEDIANA DA FOLHA DE *E. benthamii*, INDICANDO BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), CAVIDADE SECRETORA (CS), CUTÍCULA (CU), EPIDERME (EP), PARÊNQUIMA ESPONJOSO (PS), PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO (PP) E SISTEMA VASCULAR (SV)

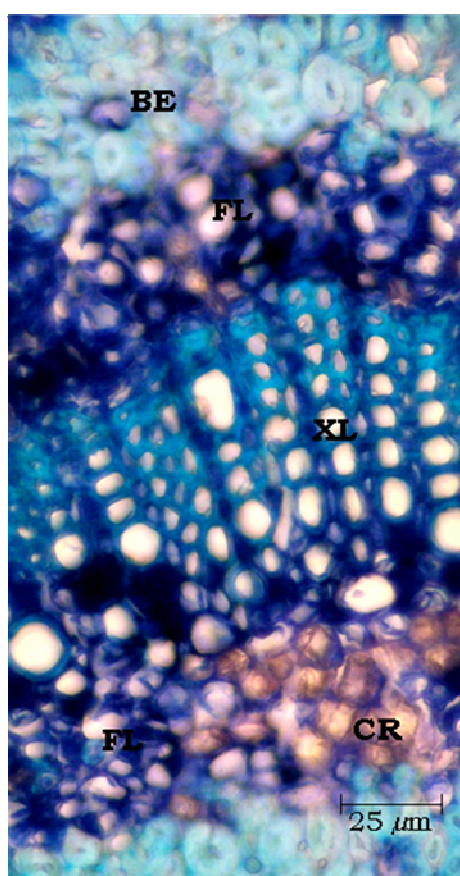


FIGURA 22 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA MEDIANA DE *E. benthamii*, DESTACANDO A BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), FLOEMA (FL), XILEMA (XL), E A PRESENÇA DE IDIOBLASTOS COM CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR)



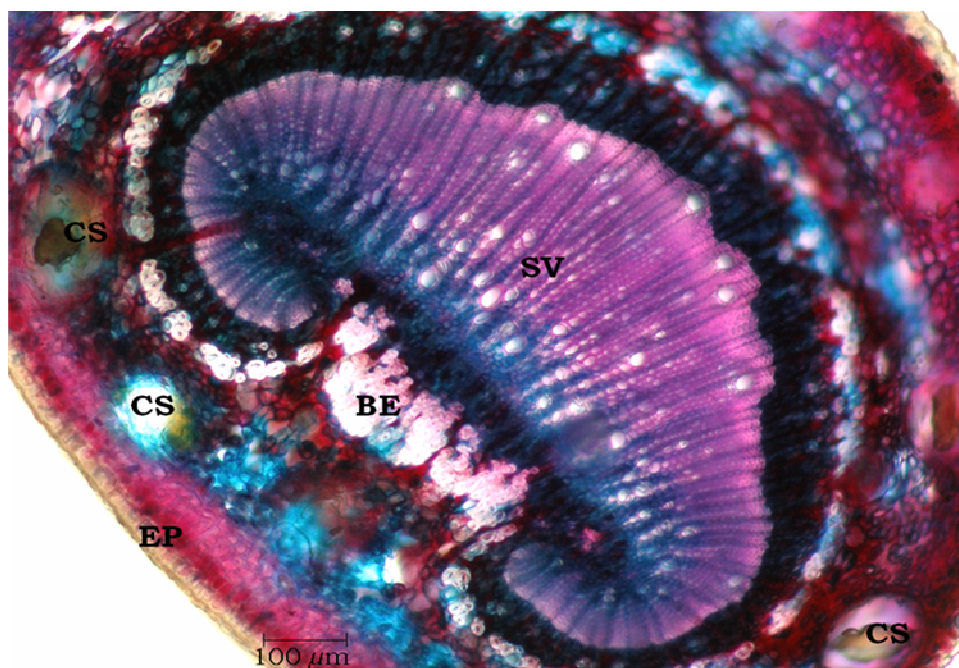


FIGURA 23 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *E. benthamii*, DEMONSTRANDO BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), CAVIDADES SECRETORAS (CS), EPIDERME (EP) E SISTEMA VASCULAR (SV)

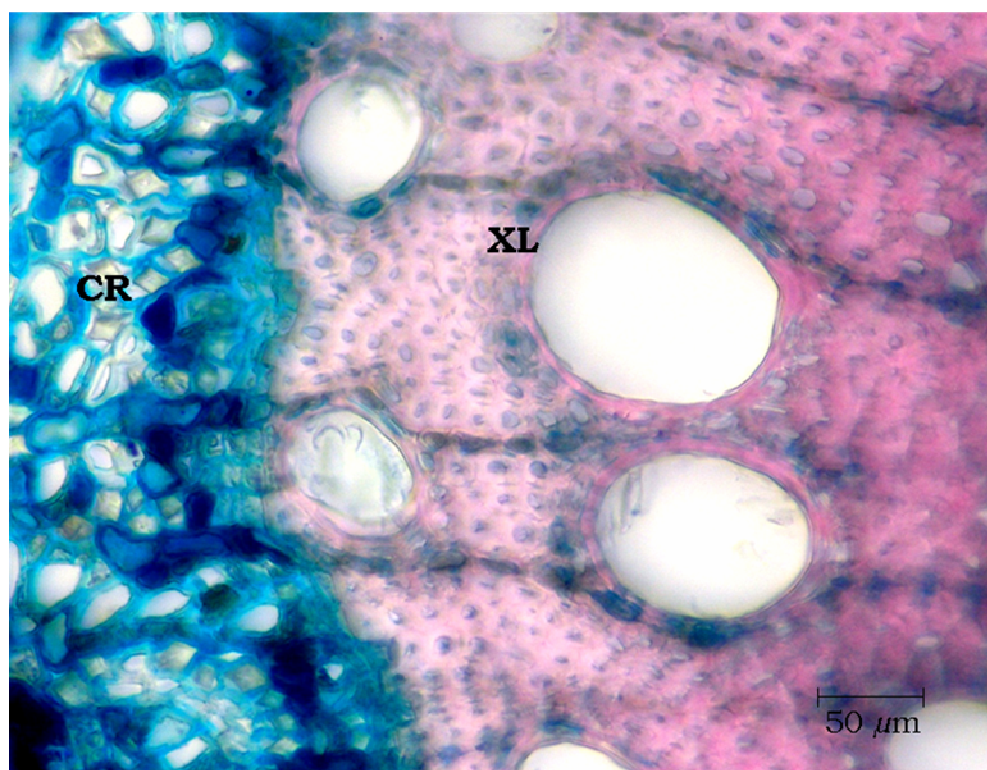


FIGURA 24 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *E. benthamii*, DESTACANDO CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR) E XILEMA (XL)

## 5.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

### 5.2.1 Características organolépticas e resíduo seco

As características organolépticas e os valores de resíduo seco obtidos para o extrato aquoso e para o extrato hidroalcoólico, elaborados a partir das folhas de *E. benthamii*, estão apresentados nas Tabelas 04 e 05.

TABELA 04 – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E RESÍDUO SECO DO EXTRATO AQUOSO, OBTIDO A PARTIR DAS FOLHAS DE *E. benthamii*

| EXTRATO AQUOSO      |                       |
|---------------------|-----------------------|
| <b>Cor</b>          | castanho-claro        |
| <b>Odor</b>         | aromático e adocicado |
| <b>pH</b>           | 5,0                   |
| <b>Resíduo seco</b> | 2,394% (m/V)          |

TABELA 05 – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E RESÍDUO SECO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, ELABORADO A PARTIR DAS FOLHAS DE *E. benthamii*

| EXTRATO HIDROALCOÓLICO |              |
|------------------------|--------------|
| <b>Cor</b>             | castanho     |
| <b>Odor</b>            | aromático    |
| <b>pH</b>              | 5,0          |
| <b>Resíduo seco</b>    | 3,128% (m/V) |

Considerando que o extrato hidroalcoólico revelou uma maior porcentagem de resíduo seco, foi possível estabelecer que as folhas de *E. benthamii* apresentam maior concentração de compostos mais hidrofóbicos do que moléculas hidrofílicas.

### 5.2.2 Marcha sistemática fitoquímica

A Tabela 06 sumariza os metabólitos secundários presentes nas folhas de *E. benthamii*, analisados a partir das frações provenientes do extrato aquoso e também, para o extrato hidroalcoólico.

TABELA 06 – METABÓLITOS VEGETAIS VERIFICADOS NO EXTRATO AQUOSO E NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO, OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *E. benthamii*

| METABÓLITO SECUNDÁRIO                   | RESULTADOS                             |                |
|---|--|----------------|
|   | Extrato hidroalcoólico<br>e/ou frações | Extrato aquoso |
| <b>Ácidos fixos</b>                     | NA                                     | Positivo (+)   |
| <b>Ácidos voláteis</b>                  | NA                                     | Positivo (+)   |
| <b>Aminogrupos</b>                      | NA                                     | Positivo (+)   |
| <b>Leucoantocianidinas</b>              | NA                                     | Positivo (+)   |
| <b>Glicosídeos cianogênicos</b>         | NA                                     | Negativo (–)   |
| <b>Taninos</b>                          |  |                |
| - Reação com sais de Ferro III          | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |
| - Reação com cloridrato de emetina      | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |
| - Reação com gelatina a 2,5%            | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |
| - Reação com sulfato de ferro amoniacal | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |
| - Reação com cianeto de potássio        | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |
| - Reação com ácido nitroso              | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |
| - Reação com formol clorídrico:         | NA                                     |                |
| Taninos hidrolisáveis                   |  | Positivo (+)   |
| Taninos condensados                     |  | Positivo (+)   |
| <b>Esteróides e/ou Triterpenos</b>      |  |                |
| - Reação de Lieberman-Burchard          | Positivo (+)                           | NA             |
| <b>Alcalóides</b>                       |  |                |
| - Reação com reativo de Dragendorff     | Negativo (–)                           | NA             |
| - Reação com reativo de Mayer           | Negativo (–)                           | NA             |
| - Reação com reativo de Wagner          | Negativo (–)                           | NA             |
| - Reação com reativo de Bertrand        | Negativo (–)                           | NA             |
| <b>Glicosídeos antraquinônicos</b>      |  |                |
| - Reação de Bornträger                  | Negativo (–)                           | NA             |
| <b>Cumarinas</b>                        | Negativo (–)                           | NA             |
| <b>Glicosídeos flavônicos</b>           |  |                |
| - Reação de Shinoda                     | Positivo (+)                           | NA             |
| - Reação oxalo-bórica                   | Positivo (+)                           | NA             |
| - Reação de Pacheco                     | Positivo (+)                           | NA             |
| - Reação com zinco                      | Positivo (+)                           | NA             |
| <b>Glicosídeos saponínicos</b>          | Positivo (+)                           | Positivo (+)   |

NA: não avaliado

As frações apolares, submetidas à reação de Lieberman-Burchard para esteróides e/ou triterpenos (FARNSWORTH, 1966), demonstraram resultado positivo, apresentando uma coloração rosada. Para a pesquisa de alcalóides, todas as frações do extrato hidroetanólico não indicaram a formação de precipitados característicos (EVANS, 1989). A reação de Bornträger para glicosídeos antraquinônicos (EVANS, 1989) não revelou a formação da coloração avermelhada que assinala a presença desse metabólito.

Para cumarinas, não foi observado o desenvolvimento de fluorescência na câmara de ultravioleta (365 nm) (HARBORNE, 1998), a partir das frações estudadas. A presença de glicosídeos flavônicos foi determinada pelas reações características (MOREIRA, 1979; FARNSWORTH, 1966). A formação de espuma nas frações acetato de etila e hidroalcoólica residual indicou a presença de glicosídeos saponínicos (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). Os ensaios qualitativos com cloridrato de emetina, gelatina, sais de ferro III e sulfato de ferro amoniacal (SANTOS; MELLO, 2007) comprovaram a presença de taninos nas folhas de *E. benthamii*.

Na pesquisa de aminogrupos, houve o desenvolvimento de coloração azul-violácea resultante da reação desenvolvida com a ninhidrina, o que qualifica a presença de aminogrupos no extrato aquoso analisado.

A presença de glicosídeos flavônicos foi determinada a partir de quatro diferentes reações. Durante as avaliações, pelo menos uma das frações submetidas aos reativos apresentou resultado positivo, o que denota a presença de glicosídeos flavônicos na amostra em estudo.

A partir dos testes conduzidos para evidenciar a existência de ácidos fixos e de ácidos voláteis no extrato aquoso de *E. benthamii*, foi determinada a presença de ambos os metabólitos vegetais, sendo que o ensaio para ácidos voláteis revelou um valor de pH igual a 4,0.

As provas utilizadas para comprovar a presença de leucoantocianidinas e de glicosídeos cianogênicos expressaram resultados, respectivamente, positivo e negativo.

No presente estudo, a presença de substâncias esteroidais e/ou triterpenóides foi confirmada nas folhas de *E. benthamii*, por meio da reação de Lieberman-Burchard. Esses resultados estão de acordo com os relatos da literatura, nos quais é possível verificar que os esteróides, particularmente o estigmasterol e o

$\delta$ -sitosterol, são largamente difundidos no reino vegetal (CONFORTI *et al.*, 2008). Balacs (1997), da mesma forma, afirmou que um dos principais constituintes químicos do grupo *Eucalyptus* são os esteróides e/ou triterpenos. Além disso, a investigação dos constituintes fitoquímicos, a partir das folhas de *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* Blakely, permitiu o isolamento e a caracterização de um triterpenóide pentacíclico (SIDDIQUI; SULTANA; BEGUM, 2000), o que corrobora com o resultado obtido.

Os alcalóides, assim como os terpenóides são um grupo de metabólitos com grande heterogeneidade estrutural. Os alcalóides são compostos nitrogenados e de extenso potencial farmacológico. A ocorrência desse grupo de metabólitos é verificada predominantemente nas Solanaceae, Papaveraceae, Rubiaceae e Apocynaceae (KUKLINSKI, 2000). Franco (2005), ao estudar a espécie *E. cinerea*, verificou a ausência de alcalóides a partir de análises fitoquímicas. As frações do extrato hidroalcoólico de *E. benthamii* submetidas à pesquisa de alcalóides apresentaram resultado negativo para todos os reativos empregados, confirmando a ausência desse metabólito em *E. benthamii*.

Os ensaios para identificar a presença de cumarinas e glicosídeos antraquinônicos nas folhas de *E. benthamii* também demonstraram resultados negativos. As antraquinonas são especialmente observadas nas famílias Rhamnaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Verbenaceae, Rubiaceae, Asphodelaceae e Caesalpiniaceae (FALKENBERG, 2007). As cumarinas são lactonas do ácido *o*-hidroxicinâmico e sua biogênese podem ser induzidas em resposta a um estresse biótico e abiótico, por uma insuficiência nutricional, por mensageiros químicos e por outros metabólitos externos. Essas substâncias são geralmente encontradas nas famílias Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae (KUSTER; ROCHA, 2007). Dessa forma, os resultados nulos evidenciados nas provas para constatar a existência de cumarinas e de glicosídeos antraquinônicos são condizentes com a literatura.

Os taninos e os glicosídeos flavônicos, constituintes fenólicos com importantes atividades biológicas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007), foram verificados em *E. benthamii*. Espécies florestais do gênero *Eucalyptus* estão entre as mais empregadas para produção de taninos. *Eucalyptus astringens* Maiden, *Eucalyptus wandoo* Blakely e *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden são alguns dos taxa utilizados para a obtenção desse grupo metabólico (HASLAM, 1966; MORI, 2000).

Vital e colaboradores (2004) evidenciaram a potencialidade da utilização dos taninos das cascas de *E. grandis* e *E. pellita* na confecção de adesivos para uso em chapas de composição para aplicação em interiores. De acordo com Costa (1986), é comum encontrar taninos, além de glicosídeos flavônicos, nos representantes do gênero *Eucalyptus*. Santos e Waterman (2001a) isolaram taninos hidrolisáveis a partir das folhas de *Eucalyptus consideniana* Maiden e *Eucalyptus viminalis* Labill., bem como glicosídeos flavônicos a partir da espécie *E. consideniana*. Esses mesmos autores obtiveram, a partir das folhas de *Eucalyptus ovata* Labill., o isolamento de outros 13 polifenóis, dentre os quais quatro flavonóis e nove taninos (SANTOS; WATERMAN, 2001b). Os ensaios investigativos para taninos e glicosídeos flavônicos, que revelaram a formação de complexos insolúveis, a presença de precipitados característicos ou o aparecimento de colorações específicas, determinando positividade para esses metabólitos, quando da avaliação dos extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas adultas de *E. benthamii*, concordam com as evidências relatadas em estudos anteriores para esse gênero.

A formação de espuma persistente no extrato hidroalcoólico de *E. benthamii* caracterizou a presença de glicosídeos saponínicos. A principal característica das saponinas é apresentar atividade tensoativa, isto é, esses compostos são capazes de formar soluções espumantes persistentes e abundantes quando em solução aquosa. As propriedades biológicas das saponinas são determinadas pelo seu comportamento anfifílico e pela habilidade em formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membrana (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). Fabrowski (2002), ao estudar a espécie *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, constatou a presença de esteróides e/ou triterpenos, taninos e glicosídeos saponínicos e glicosídeos flavônicos.

A presença de ácidos orgânicos, fixos e voláteis, foi comprovada no extrato aquoso das folhas adultas de *E. benthamii*.

O resultado positivo para leucoantocianidinas foi condizente com a pesquisa de glicosídeos flavônicos, pois esses metabólitos vegetais se enquadram como uma classe de flavonóides, nos quais é possível encontrar estruturas oligomerizadas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os glicosídeos cianogênicos são compostos nitrogenados com função de proteção e com ocorrência, principalmente, nas famílias Rosaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae e Linaceae (SIMÕES *et al.*, 2007). Esses metabólitos secundários



formam ácido cianídrico, por hidrólise, tornando-se altamente tóxicos. Essa degradação dos glicosídeos cianogênicos, com formação de ácido cianídrico, somente ocorre quando os tecidos vegetais são lesados, pois esses compostos orgânicos e as enzimas, capazes de degradá-los, localizam-se em compartimentos separados (SANTOS, 2007). Dessa forma, o resultado negativo obtido para os glicosídeos cianogênicos é condizente com a literatura, uma vez que essas substâncias não são verificadas, normalmente, em representantes do gênero *Eucalyptus*.

Ponderando as informações relatadas nos trabalhos prévios, é possível afirmar que os resultados obtidos por meio da triagem fitoquímica para as frações procedentes do extrato hidroalcoólico e também, para o extrato aquoso proveniente das folhas de *E. benthamii* está em conformidade com os metabólitos secundários usualmente evidenciados para o gênero *Eucalyptus*.

#### 5.2.3 Extração e determinação quantitativa do óleo essencial

Durante o processo de extração por meio do aparato de Clevenger, foi observado que o óleo essencial de *E. benthamii* possui uma densidade menor do que a densidade da água, uma coloração amarela claro e um odor característico, bastante pronunciado.

O rendimento do óleo essencial em estudo foi determinado após 6 h de hidrodestilação, sendo que os resultados estão sumarizados na Tabela 07. O óleo essencial de *E. benthamii*, da coleta de outono, revelou um rendimento médio de 1,13%, enquanto que o óleo volátil proveniente da coleta de primavera apresentou um rendimento médio de 1,38%. Esses resultados podem ser correlacionados com as diferentes condições climáticas a partir das datas de coleta, conforme o previamente relatado por Simões e Spitzer (2007).

Durante o experimento, foi verificado que a maior parte do óleo essencial de *E. benthamii*, a partir das coletas de outono e primavera, foi extraído no início da hidrodestilação. Franco (2005) verificou que para a espécie *E. cinerea*, mais da metade da quantidade total de essência extraída, foi obtida na primeira hora de destilação. Da mesma forma, para *E. smithii*, foi observado que há maior rendimento de óleo volátil no início do processo de extração (FABROWSKI, 2002).

Astearaceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae são algumas das famílias que contêm mais espécies que

biossintetizam óleos voláteis (SIMÕES; SPITZER, 2007). Nesse aspecto, Myrtaceae é um dos grupos que mais congrega gêneros com representantes que apresentam óleo essencial (ALONSO, 1998). Dentre as ações farmacológicas exercidas pelas essências, é possível destacar diferentes atividades como: anti-inflamatória, antisséptica, antiespasmódica e anestésica local (SIMÕES; SPITZER, 2007). Também, é importante mencionar que os óleos voláteis isolados podem apresentar uma toxicidade elevada, o que pode causar irritação, sensibilização, fototoxicidade cutânea e efeitos convulsivos e/ou psicotrópicos (SOUZA *et al.*, 2008).

Silva, Brito e Silva Júnior (2006), ao avaliarem o potencial de onze espécies de eucalipto para a produção de óleo essencial, determinaram o rendimento do óleo volátil de *E. benthamii*, a partir de espécimes coletados em Correia Pinto – SC (27°35' S, 50°21' W). Para a coleta realizada durante o período de outono, foi verificado um rendimento de 0,40% para o óleo essencial extraído das folhas de *E. benthamii*. O rendimento encontrado para o óleo volátil, obtido a partir de folhas coletadas durante a primavera, foi de 0,15%. Os rendimentos observados pelos pesquisadores mencionados são inferiores aos valores obtidos na presente investigação. Esse fato pode estar relacionado às condições edafo-climáticas diferenciadas entre as regiões em análise, às condições extrativas adotadas em cada caso e ao teor de umidade presente no material botânico.

TABELA 07 – TEOR DE UMIDADE NAS FOLHAS DE *E. benthamii* E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO A PARTIR DO PROCESSO DE HIDRODESTILAÇÃO

| DATA E HORA DA<br>COLETA          | LOCAL             | TEOR DE UMIDADE<br>NAS FOLHAS DE<br><i>E. benthamii</i> (%) | RENDIMENTO DO<br>ÓLEO ESSENCIAL<br>DAS FOLHAS DE<br><i>E. benthamii</i> (%) |
|-----------------------------------|-------------------|---|---|
| 19/06/2008; 10:35 h<br>(OUTONO)   | Embrapa Florestas | 9,43 ± 0,21   | 1,13 ± 0,06   |
| 02/12/2008; 9:50 h<br>(PRIMAVERA) | Embrapa Florestas | 9,61 ± 0,22   | 1,38 ± 0,10   |

#### 5.2.4. Determinação do teor de umidade

A partir do ensaio de perda por dessecação, foi verificada uma umidade média de 9,43 e de 9,61% para o material foliar fragmentado e dessecado, referente às coletas de outono e de primavera, respectivamente.

#### 5.2.5. Análises físicas

Os resultados verificados para as análises físicas dos óleos essenciais extraídos a partir de folhas coletadas durante o outono e a primavera, estão, respectivamente, indicados nas Tabelas 08 e 09. Valores assemelhados de densidade relativa e de índice de refração foram observados para os óleos voláteis provenientes das diferentes coletas realizadas. A amostra de primavera revelou uma solubilidade maior em álcool etílico, nas graduações alcoólicas de 70, 80 e 90% (V/V), em relação ao óleo volátil de outono.

TABELA 08 – ANÁLISES FÍSICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*, EXTRAÍDO DAS FOLHAS COLETADAS NO OUTONO

| ENSAIO                                   | RESULTADOS    |
|--|---------------|
| Densidade relativa ( $d_{20}^{20}$ )     | 0,8915 g/mL   |
| Índice de refração ( $n_D^{20}$ )        | 1,4977        |
| Solubilidade em álcool etílico 70% (V/V) | 1:172         |
| Solubilidade em álcool etílico 80% (V/V) | 1:19          |
| Solubilidade em álcool etílico 90% (V/V) | 1:3,5         |
| Solubilidade em álcool etílico absoluto  | 1:1 (solúvel) |

TABELA 09 – ANÁLISES FÍSICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* EXTRAÍDO DAS FOLHAS COLETADAS NA PRIMAVERA

| ENSAIO                                   | RESULTADOS    |
|--|---------------|
| Densidade relativa ( $d_{20}^{20}$ )     | 0,8945 g/mL   |
| Índice de refração ( $n_D^{20}$ )        | 1,4996        |
| Solubilidade em álcool etílico 70% (V/V) | 1:111         |
| Solubilidade em álcool etílico 80% (V/V) | 1:17          |
| Solubilidade em álcool etílico 90% (V/V) | 1:3           |
| Solubilidade em álcool etílico absoluto  | 1:1 (solúvel) |

#### 5.2.6 Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas

A composição química dos óleos essenciais de *E. benthamii*, obtidos a partir das folhas dessecadas e coletadas no outono e na primavera, está compilada na Tabela 10. As Figuras 25 a 27 apresentam os cromatogramas referentes à amostra de outono. O constituinte majoritário identificado no óleo volátil da coleta de outono, por meio da cromatografia gasosa acoplada a detector de massas, foi o  $\alpha$ -pineno (22,63%), seguido de  $\gamma$ -terpineno (16,55%), *p*-cimeno (10,60%), aromadendreno (9,94%) e terpin-4-ol (5,88%). Diferentemente do verificado para outras espécies de *Eucalyptus* (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2005; FRANCO, 2005; YANG *et al.*, 2004; SILVESTRE *et al.*, 1997; BARTON; TJANDRA; NICHOLAS, 1989), a porcentagem de 1,8-cineol ou eucaliptol que compõe o óleo essencial de *E. benthamii* para essa coleta foi baixa, de apenas 0,54%. O 1,8-cineol é o componente predominante de *E. globulus*, que é a espécie farmacopeica. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2000), essa droga vegetal é constituída pelas folhas de eucalipto, que devem conter, no mínimo, 0,8% em óleo essencial, constituído de, pelo menos, 70% de 1,8-cineol. O eucaliptol também pode ser identificado majoritariamente no óleo volátil de muitas outras espécies desse gênero. Esses taxa são utilizados na terapêutica, justamente em função do elevado teor de 1,8-cineol. No entanto, óleos essenciais obtidos a partir de outras espécies de *Eucalyptus*, que contêm menores teores de 1,8-cineol, podem ser empregados para fins industriais e em perfumaria (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Foram identificados, majoritariamente, no óleo volátil extraído a partir das folhas colhidas durante a primavera, os compostos  $\alpha$ -pineno (20,84%),  $\gamma$ -terpineno (11,01%), *p*-cimeno (14,10%), aromadendreno (8,78%), terpin-4-ol (4,21%) e globulol (15,17%). As Figuras 28 a 30 apresentam os cromatogramas referentes à amostra de primavera. Os compostos verificados para a coleta de primavera foram muito semelhantes aos identificados no óleo essencial referente à amostra de outono. No entanto, foi constatado um teor de 15,17% para o sesquiterpeno globulol, o qual apresentou concentração de apenas 1,90% para o óleo volátil obtido a partir da coleta de outono. Esse fato pode estar relacionado às diferenças climáticas, a partir das coletas efetuadas.

TABELA 10 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* OBTIDA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS

| IDENTIFICAÇÃO                | ÍNDICE DE RETENÇÃO | PORCENTAGEM RELATIVA (%) |           |
|------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------|
|                              |                    | OUTONO                   | PRIMAVERA |
| $\alpha$ -pineno             | 937                | 22,63                    | 20,84     |
| canfeno                      | 948                | 0,12                     | 0,18      |
| $\beta$ -pineno              | 977                | 0,37                     | 0,35      |
| $\beta$ -mirceno             | 991                | 0,22                     | -         |
| <i>p</i> -cimeno             | 1026               | 10,60                    | 14,10     |
| limoneno                     | 1028               | 1,00                     | 1,50      |
| 1,8-cineol                   | 1031               | 0,54                     | -         |
| $\gamma$ -terpineno          | 1061               | 16,55                    | 11,01     |
| terpinoleno                  | 1087               | 0,38                     | 0,44      |
| linalol                      | 1101               | 2,16                     | 0,90      |
| endo-fenchol                 | 1113               | 0,14                     | 0,17      |
| <i>trans</i> -pinocarveol    | 1137               | 0,66                     | 1,22      |
| borneol                      | 1164               | 0,34                     | 0,40      |
| terpin-4-ol                  | 1179               | 5,88                     | 4,21      |
| $\alpha$ -terpineol          | 1191               | 1,43                     | 1,37      |
| neral ( <i>Z</i> -citral)    | 1240               | 0,19                     | -         |
| geranial ( <i>E</i> -citral) | 1269               | 0,22                     | -         |
| <i>p</i> -cimen-7-ol         | 1286               | 0,39                     | 0,90      |
| isoleveno                    | 1370               | 0,15                     | -         |
| $\alpha$ -gurjuneno          | 1407               | 0,92                     | 0,35      |
| $\beta$ -gurjuneno           | 1428               | 0,47                     | 0,40      |
| aromadendreno                | 1439               | 9,94                     | 8,78      |
| allo-aromadendreno           | 1458               | 1,43                     | 1,21      |
| $\beta$ -selineno            | 1484               | 0,27                     | 0,24      |
| viridifloreno                | 1491               | 0,44                     | 0,54      |
| $\delta$ -cadineno           | 1520               | 0,18                     | -         |
| nerolidol                    | 1565               | 2,15                     | 1,10      |
| globulol                     | 1590               | 1,90                     | 15,17     |
| rosifoliol                   | 1599               | 0,93                     | 1,33      |
| epi- $\alpha$ -cadinol       | 1638               | 0,44                     | 0,51      |
| $\alpha$ -cadinol            | 1651               | 0,28                     | 0,48      |

Em estudo com as folhas de *Eucalyptus dealbata* A. Cunn. ex Schauer, os pesquisadores avaliaram o efeito do método de destilação e da época de colheita sobre a composição química do óleo essencial. Foi observado um maior conteúdo de  $\alpha$ -pineno para as amostras de outono (16,3%) e de verão (23,5%). No caso do 1,8-cineol, a maior concentração desse monoterpene foi verificada no inverno (70,0%). Em relação ao método de destilação, foi constatado um maior conteúdo de  $\alpha$ -pineno e de 1,8-cineol para a hidrodestilação, em relação à destilação conduzida com água e vapor ou somente a vapor (SEFIDKON; BAHMANZADEGAN; ASSAREH, 2008).

Ammon, Clarke e Tjandra, (1985) verificaram que espécimes de *Eucalyptus polybractea* R. T. Baker e de *Eucalyptus viridis* R. T. Baker revelaram um decréscimo no teor de 1,8-cineol presente no óleo essencial de suas folhas, durante os meses de inverno. Entretanto, ao investigar o efeito da variação sazonal sobre a concentração de eucaliptol para os óleos voláteis de *Eucalyptus kochii* Maiden & Blakely subsp. *kochii* e *Eucalyptus kochii* subsp. *plenissima* (C. A. Gardner) Brooker, foi constatada uma pequena influência da época de coleta na concentração de 1,8-cineol.

Na avaliação química de óleos essenciais provenientes do material foliar de *E. kochii* subsp. *kochii*, *E. kochii* subsp. *plenissima* e *Eucalyptus oleosa* var. *borealis* C. A. Gardner, obtidos a partir de hidrodestilação e de extração por fluido supercrítico, Barton, Tjandra e Nicholas (1989) identificaram, majoritariamente, compostos monoterpénóides, sendo que o teor de 1,8-cineol variou entre 80 e 90% nas três espécies estudadas.

Lucia e colaboradores (2008), ao estabelecerem a correlação entre o rendimento, a composição química e a bioatividade de óleos essenciais, provenientes das folhas de 12 espécies de *Eucalyptus*, contra as larvas de *Aedes aegypti*, observaram que os taxa com alto rendimento de óleo volátil têm elevado teor de 1,8-cineol e baixa concentração de *p*-cimeno, e apresentam menor efeito sobre as larvas de *A. aegypti*. Dentre as espécies estudadas, as que indicaram menores teores de 1,8-cineol foram *Eucalyptus gunnii* Hook (17,95%), *E. tereticormis* (18,59%) e *E. camaldulensis* (19,13%). Os representantes híbridos de *E. grandis* x *E. tereticormis* e *E. grandis* x *E. camaldulensis* revelaram as maiores concentrações de  $\alpha$ -pineno em seus óleos essenciais, 22,80% e 30,65%, respectivamente.

Cheng *et al.* (2009) analisaram a composição química e a atividade larvicida das essências de *E. camaldulensis* e *E. urophylla*, espécimes localizados na região leste de Taiwan, e evidenciaram, respectivamente, 22,52 e 6,25% de  $\alpha$ -pineno nos óleos essenciais extraídos das folhas frescas dessas duas espécies. O conteúdo de 1,8-cineol verificado no óleo volátil de *E. camaldulensis* foi de 9,48%, sendo que para *E. urophylla* foi encontrado 58,34% desse mesmo componente químico. Os autores também constataram um elevado efeito inibitório do óleo essencial de *E. camaldulensis* contra as larvas de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, diferentemente do apurado para a outra espécie pesquisada. Entretanto, Silva, Brito e Silva Júnior (2006), identificaram o composto 1,8-cineol como o constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *E. camaldulensis*, a partir de exemplares coletados na região Sudeste do Brasil, com variação no seu teor de 28 a 52,1%. Essa heterogeneidade na constituição química desse óleo volátil pode estar relacionada a fatores geográficos, edáficos e climáticos, bem como ao procedimento extrativo.

No estudo da variação da composição química e do rendimento do óleo essencial de *E. globulus* subsp. *globulus*, obtido a partir de espécimes de Portugal, foi observado que as folhas adultas contêm maior conteúdo de 1,8-cineol (de 62,5 a 71%) em relação às folhas jovens (de 48 a 62,5%), embora o rendimento tenha sido melhor para o material jovem (SILVESTRE *et al.*, 1997).

Yang e colaboradores (2004) quantificaram 90% de 1,8-cineol e 2,2% de  $\alpha$ -pineno no óleo essencial das folhas de *E. globulus*.

Para o óleo essencial do material foliar de *Eucalyptus microcorys* F. Muller, Almeida e colaboradores (2005) identificaram o monoterpênóide 1,8-cineol, com teor de 87%, como o constituinte principal.

Sartorelli *et al.* (2007) observaram que o óleo volátil extraído por meio de hidrodestilação, das folhas de *E. robusta*, coletadas durante o outono, apresentou um alto teor de  $\alpha$ -pineno (73%). Os mesmos autores, ao analisarem o óleo essencial de *E. saligna*, comprovaram diferenças químicas, de acordo com o estágio fenológico das folhas. Foi identificada a presença de  $\alpha$ -pineno somente no óleo volátil obtido a partir de folhas coletadas de árvores em floração, sendo que o seu teor foi de 45,1%.

Babu e Singh (2009), ao estudarem a otimização da produção de 1,8-cineol a partir de *E. cinerea*, encontraram maiores teores de 1,8-cineol no óleo essencial obtido a partir das folhas frescas (84,4%) em relação às folhas dessecadas por 24 h

(77,6%). Franco (2005), também avaliando a espécie *E. cinerea*, identificou como componentes principais do óleo volátil das folhas, os compostos 1,8-cineol (75,70%),  $\alpha$ -terpineol (9,67%), *o*-cimeno (8,42%) e  $\alpha$ -pineno (6,21%).

Silva, Brito e Silva Júnior (2006), ao verificarem o potencial de espécies de *Eucalyptus* para a produção de óleos essenciais, identificaram o 1,8-cineol como o constituinte principal de *E. viminalis* (85,6%), *E. globulus* (85,5%), *E. dunni* (67%), *Eucalyptus propinqua* H. Deane & Maiden (60,5%), *E. tereticormis* (54,8%), *E. camaldulensis* (40,8%) e *Eucalyptus maculata* Hook. (28,7%). Para *E. benthamii* e *Eucalyptus cloeziana* F.Muell., o constituinte predominante foi o  $\alpha$ -pineno. Nesse mesmo estudo, o teor de  $\alpha$ -pineno no óleo essencial de *E. benthamii* foi de 47,6%, quando obtido a partir das folhas coletadas no outono, e de 24,2% para o óleo volátil resultante da coleta de primavera.

O terpeno  $\alpha$ -pineno, constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *E. benthamii*, tem sido relacionado à atividade antibacteriana (LEITE *et al.*, 2007) e inseticida, bem como ao uso industrial para a obtenção da cânfora e para a produção de perfumes (MERCK CD, 2001) .

Considerando a maioria dos dados evidenciados na literatura, *E. benthamii* apresenta um óleo essencial com constituição química diferenciada, visto que contém um ínfimo conteúdo de 1,8-cineol e uma concentração relativamente elevada de  $\alpha$ -pineno. A exemplo do óleo essencial de *E. camaldulensis*, o qual também contém o  $\alpha$ -pineno como o constituinte majoritário (CHENG *et al.*, 2009; LUCIA *et al.*, 2008), o óleo volátil de *E. benthamii* apresenta o *p*-cimeno como um dos constituintes principais. Esse composto, além da importância na indústria química, tem sido estudado pelo potencial conservante demonstrado em sucos de frutas (KISKÓ; ROLLER, 2005). As diferenças verificadas no óleo essencial de *E. benthamii*, especialmente referentes ao conteúdo de  $\alpha$ -pineno (SILVA; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2006), podem ser esclarecidas pela análise das condições edafo-climáticas.



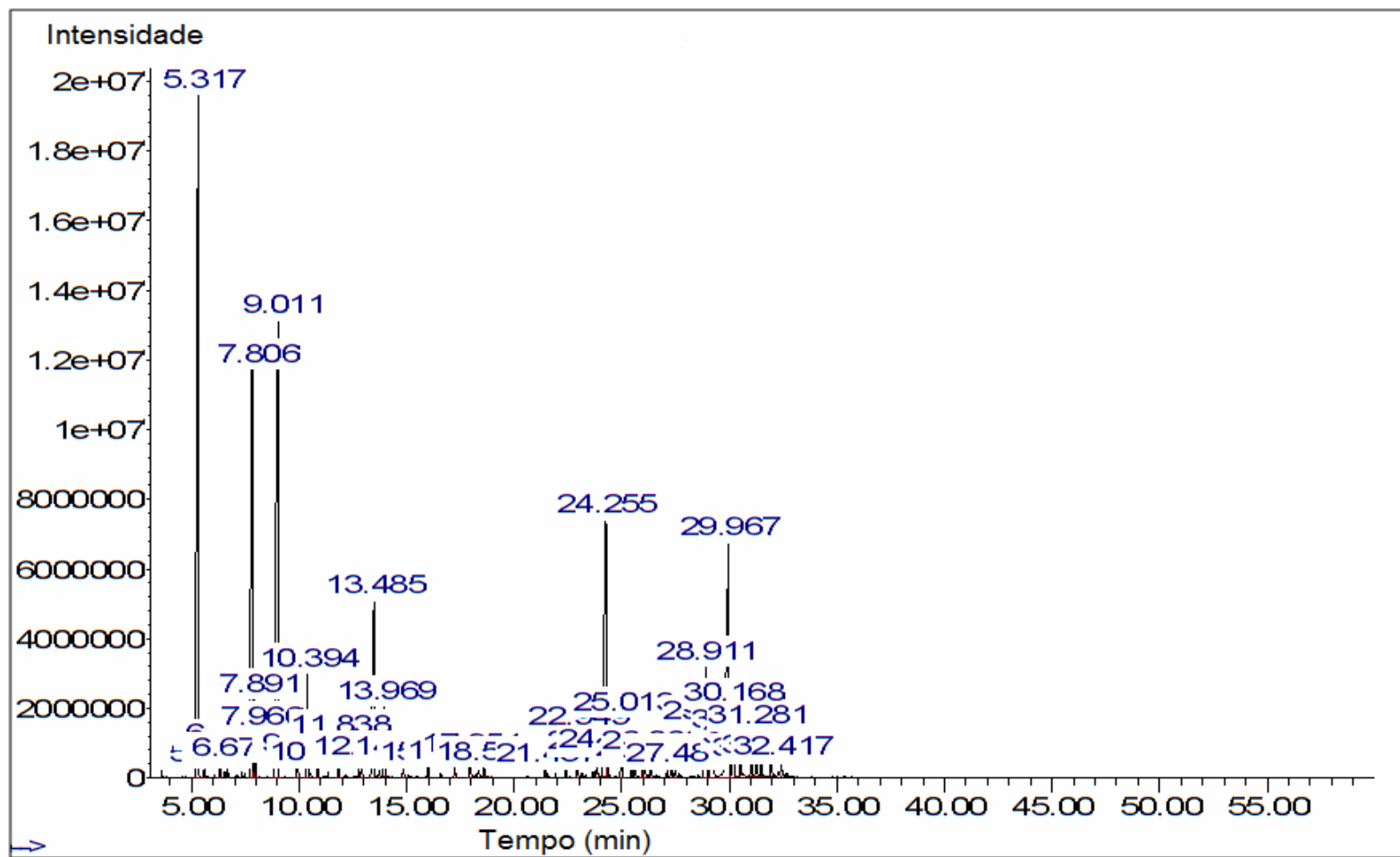


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DA COLETA DE OUTONO, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

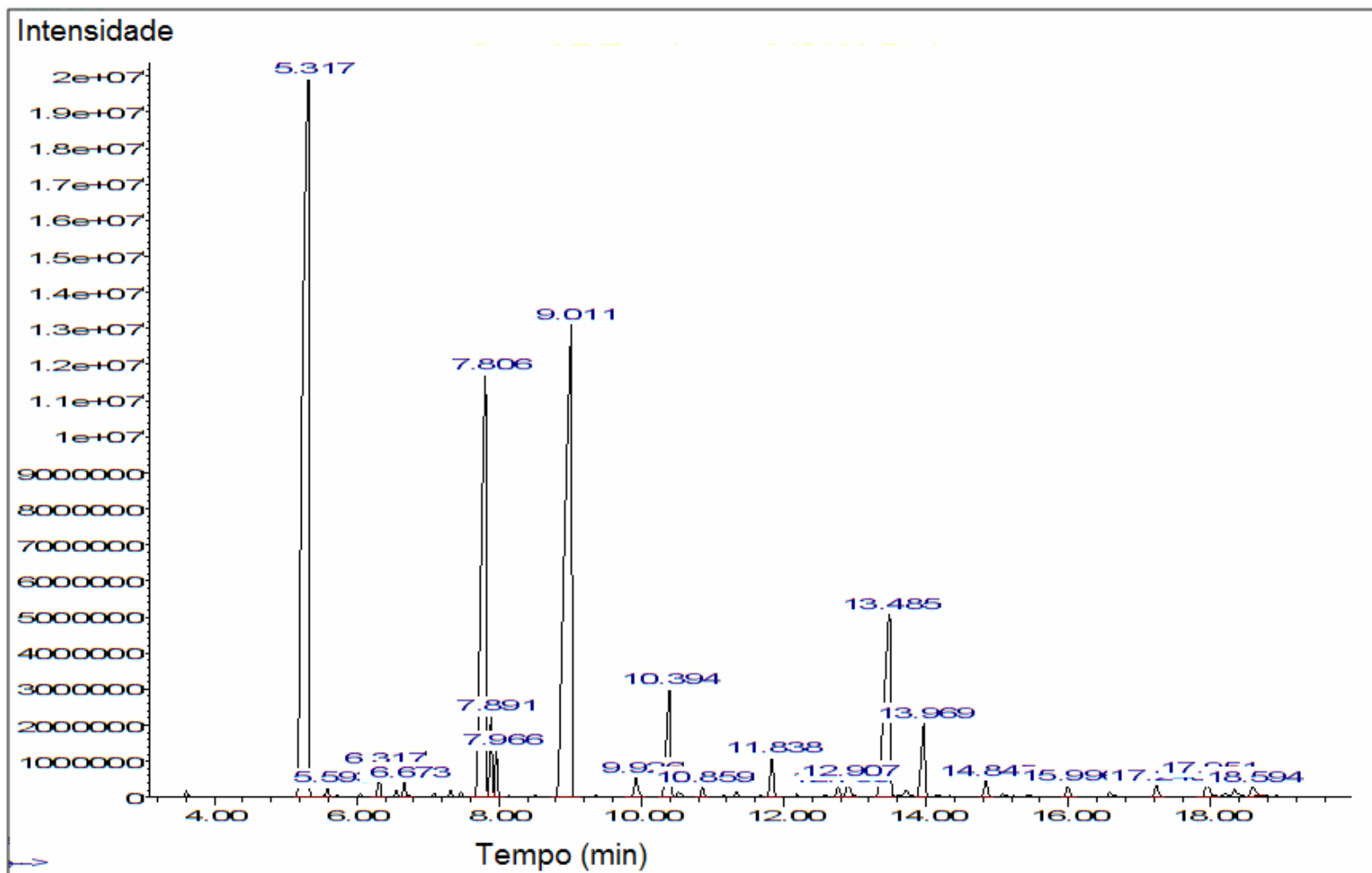


FIGURA 26 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (5-20 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DA COLETA DE OUTONO, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

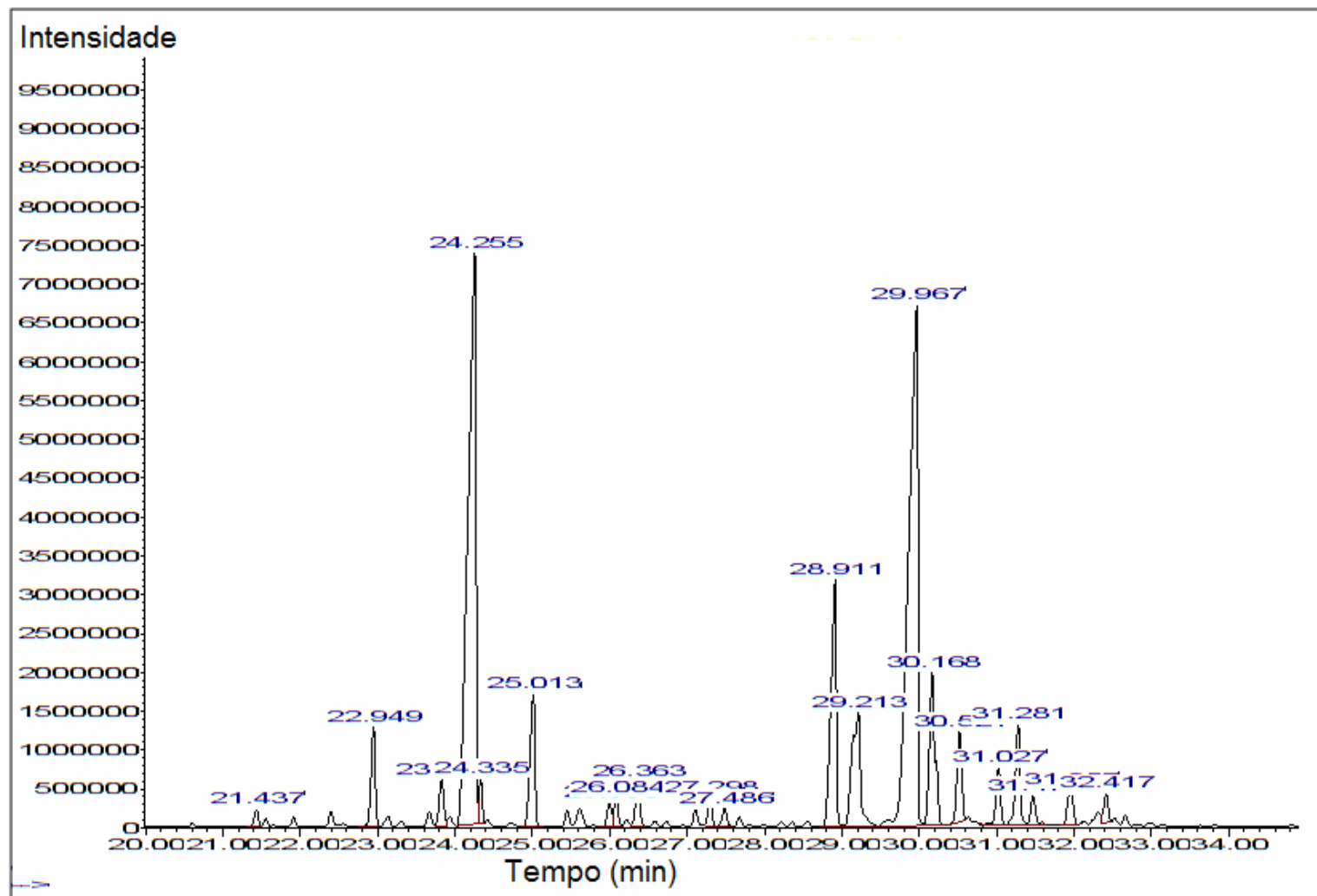


FIGURA 27 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-35 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DA COLETA DE OUTONO, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

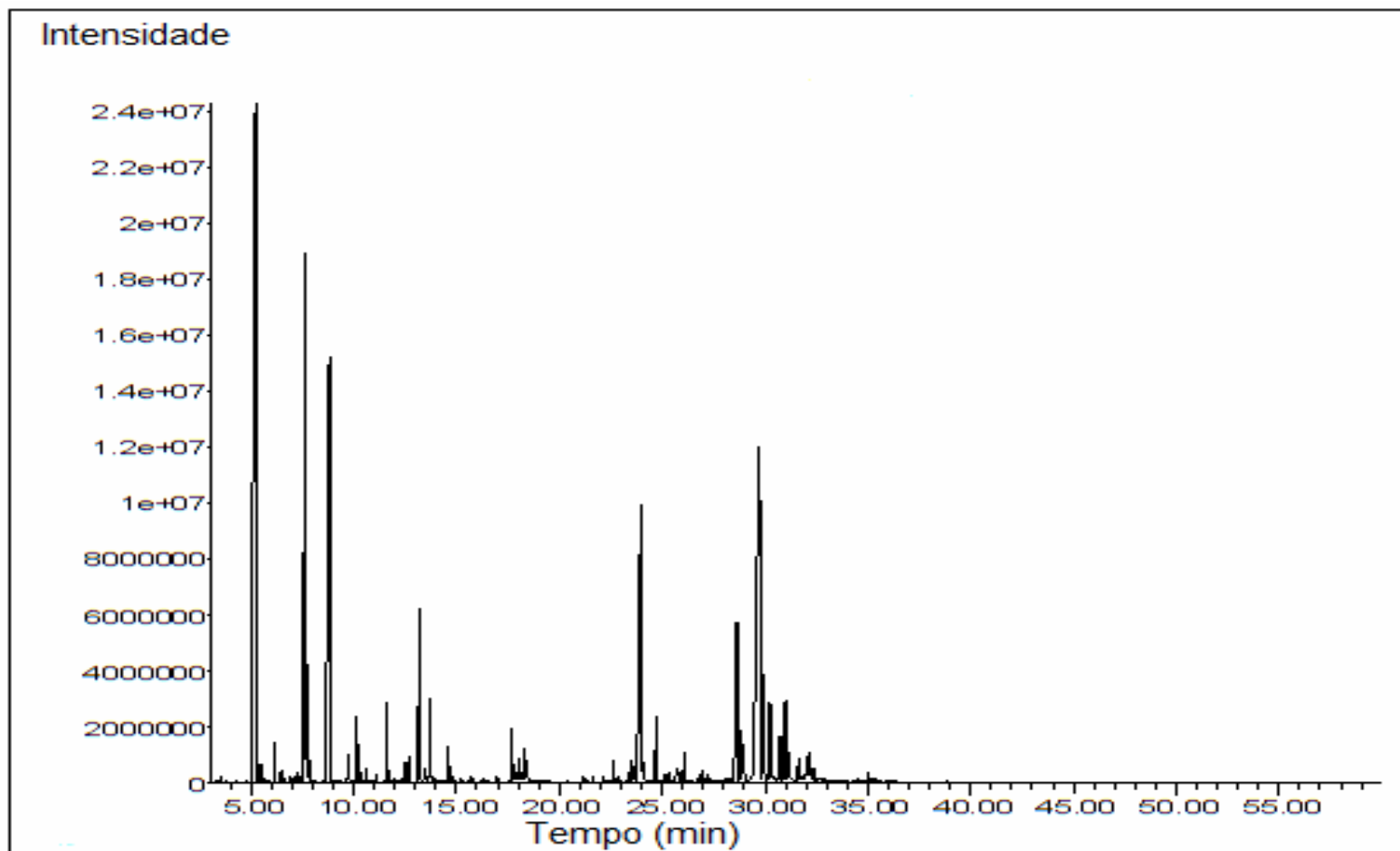


FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DA COLETA DE PRIMAVERA, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

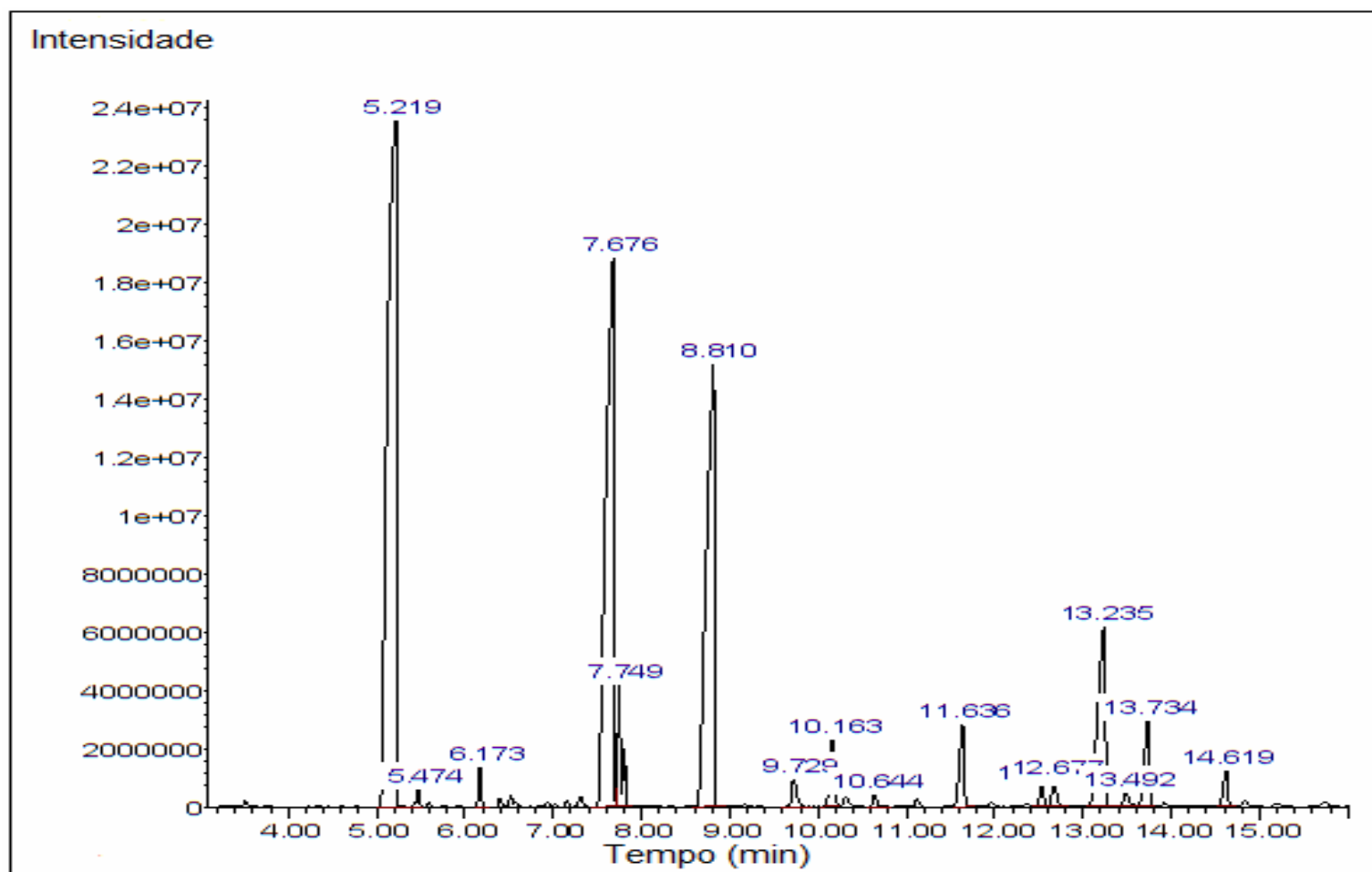


FIGURA 29 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (3-16 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DA COLETA DE PRIMAVERA, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

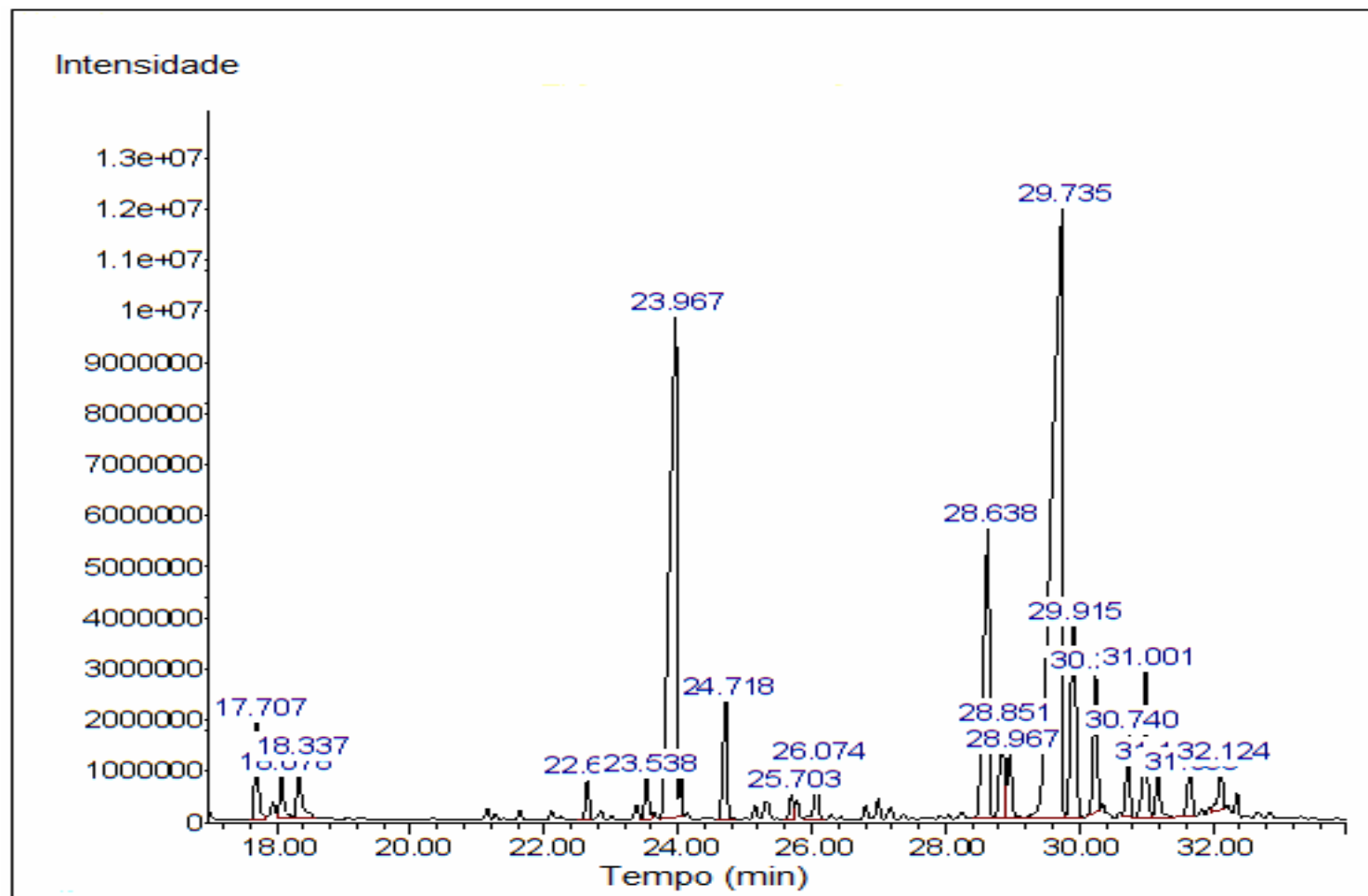


FIGURA 30 – CROMATOGRAMA EXPANDIDO (17-34 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DA COLETA DE PRIMAVERA, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

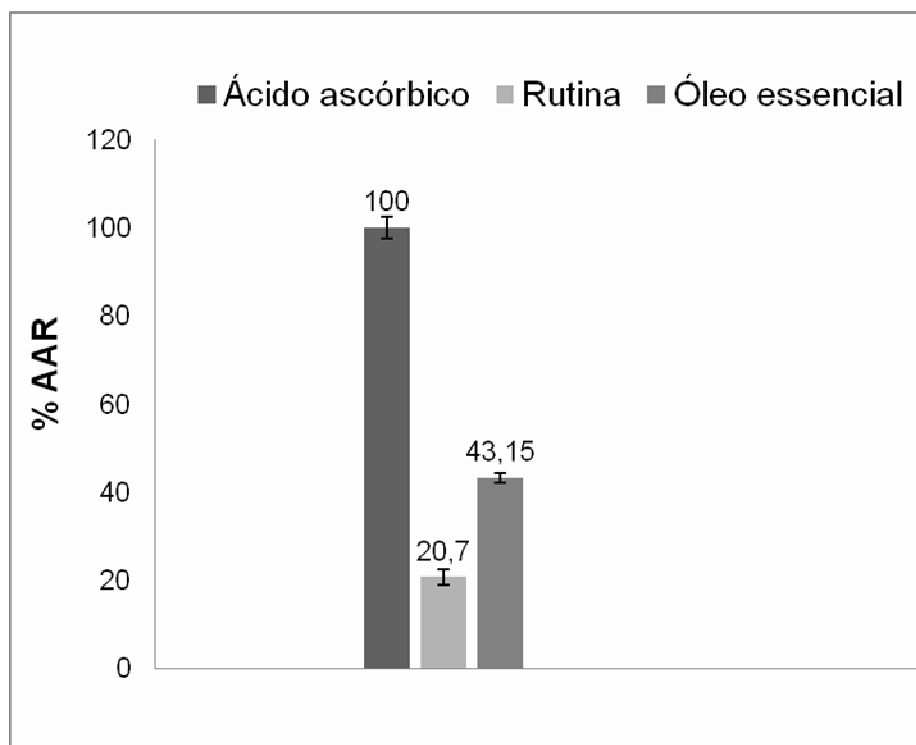
### 5.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 5.3.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial de *E. benthamii* foi avaliada por meio do método do fosfomolibdênio e do método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).

##### 5.3.1.1 Método do fosfomolibdênio

A Figura 31 representa a atividade antioxidante relativa (%AAR) do óleo essencial de *E. benthamii*, em relação aos padrões de rutina e de ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi selecionado como substância de referência para o ensaio experimental, considerando que sua atividade antioxidante foi de 100%, conforme preconizado pela literatura (PRIETTO; PINEDA; AGUILAR, 1999).



\* teste *t*: resultado estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ )

A barra de erro representa o desvio padrão da atividade antioxidante do óleo essencial de *E. benthamii* ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em relação à atividade antioxidante do ácido ascórbico ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e da rutina ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), obtidos a partir de dois ensaios independentes, efetuados em triplicata

FIGURA 31 – MÉDIA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO\*, FRENTE AOS PADRÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE RUTINA

De acordo com os resultados apresentados, foi verificado que a rutina, um derivado glicado da quercetina, revelou uma AAR de  $20,70 \pm 1,69\%$  em comparação ao ácido ascórbico, adotado como substância de referência. O óleo essencial demonstrou uma capacidade de reduzir o complexo fosfomolibdênico com  $43,15 \pm 1,08\%$  de AAR. É possível observar que o valor de AAR obtido para o óleo essencial, embora inferior ao encontrado para a substância de referência, foi superior ao valor apurado para a rutina, um flavonóide de comprovada ação antioxidante.

#### 5.3.1.2 Método do DPPH

A Figura 32 apresenta a atividade antioxidante estabelecida pelo método de redução do radical livre DPPH, a partir de diferentes concentrações do óleo volátil de *E. benthamii*.

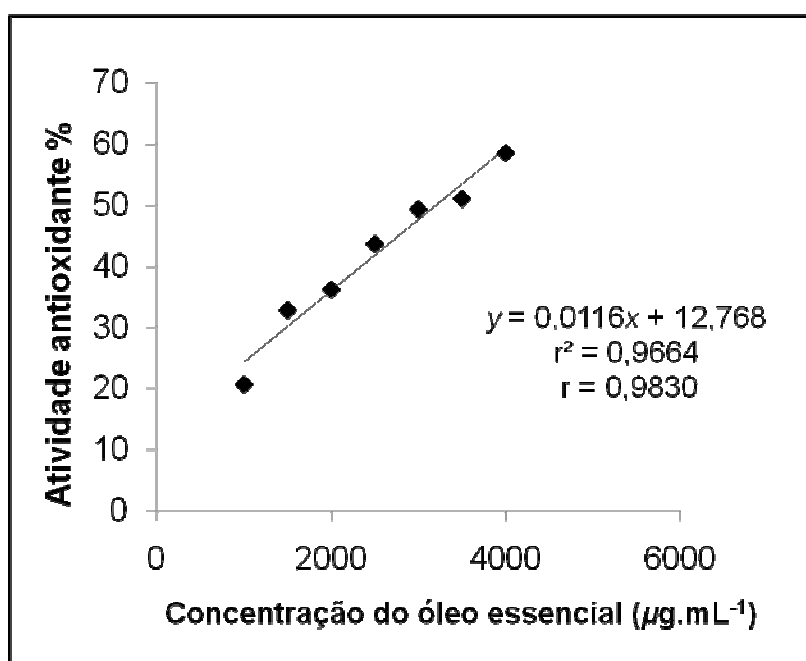


FIGURA 32 – CURVA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH, A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*

Considerando os resultados obtidos a partir da curva analítica, a capacidade antioxidante do óleo essencial de *E. benthamii* pode ser explicada pela equação de reta  $y = 0,0116x + 12,768$ . Substituindo o valor de  $y$  por 50, foi determinado um valor



de  $IC_{50}$  de  $3,21 \pm 0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$ , de forma que, para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, foram necessários  $3,21 \text{ mg.mL}^{-1}$  do óleo essencial de *E. benthamii*.

Para os padrões de rutina e de ácido ascórbico, foram estabelecidos valores de  $IC_{50}$  muito inferiores, conforme indicado na Tabela 11.

TABELA 11 – RESULTADOS DE  $IC_{50}$  PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*, FRENTE AOS PADRÕES DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DE RUTINA, A PARTIR DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH

| AMOSTRA           | $IC_{50} \pm DP (\mu\text{g.mL}^{-1})$ |
|-------------------|--|
| ÓLEO ESSENCIAL*   | $3209,6551 \pm 218,8623$ (CV = 6,82%)  |
| ÁCIDO ASCÓRBICO** | $2,4536 \pm 0,0573$ (CV = 2,34%)       |
| RUTINA**          | $2,6589 \pm 0,2234$ (CV = 8,40%)       |

\* teste *t*: resultado estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ )

\*\* teste *t*: resultados estatisticamente iguais ( $p = 0,20$ )

O ensaio do fosfomolibdênio ou de redução do complexo fosfomolibdênico tem sido utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total de óleos essenciais e de outras substâncias, a partir da redução do molibdênio (VI) ( $\text{Mo}^{+6}$ ) para molibdênio (V) ( $\text{Mo}^{+5}$ ), com a formação de um complexo fosfato- $\text{Mo}^{+5}$  de coloração verde, em pH ácido (PRIETTO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Por sua vez, a capacidade antioxidante do radical livre DPPH tem sido justificada pela habilidade desse radical livre receber especificamente um elétron ou um radical hidrogênio proveniente da amostra.

O radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é um radical cromóforo e estável, que pode sofrer redução em meio alcoólico, formando a molécula diamagnética estável de difenil-pícril-hidrazina, conforme representação da Figura 33.

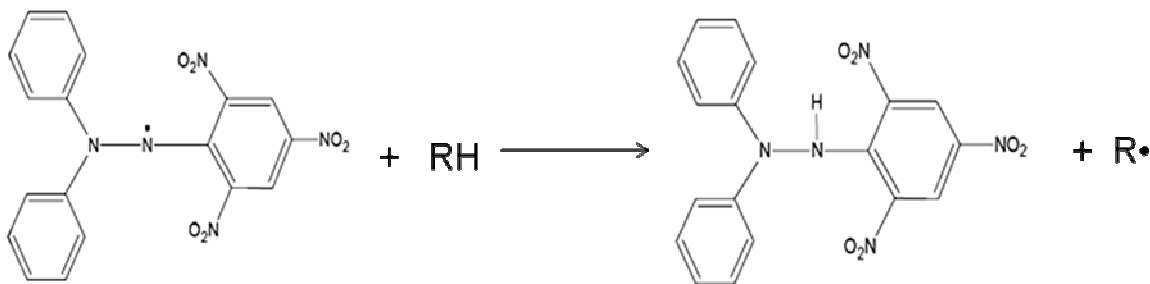


FIGURA 33 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO QUÍMICA DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH

A partir da redução do radical livre DPPH, ocorre a mudança da coloração violeta original, característica da solução contendo o radical livre DPPH, para uma coloração amarelada.

Entretanto, embora o DPPH possa ser reduzido por substâncias poli-hidroxi-aromáticas, glutathiona, tocoferol, aminas aromáticas, cisteína e ácido ascórbico, esse radical não possui capacidade redox suficiente para ser reduzido pela glucose e por substâncias aromáticas que contêm somente uma hidroxila (BLOIS, 1958). Nesse contexto, considerando que os óleos essenciais possuem poucos compostos aromáticos com mais de uma hidroxila (SIMÕES; SPITZER, 2007), é possível afirmar que o radical livre DPPH não tem uma capacidade redox satisfatória para sofrer redução pelos constituintes voláteis insaturados. Apenas óleos essenciais com substâncias poli-hidroxiladas ou que apresentem hidroxilas ácidas podem revelar um potencial antioxidante mais elevado e baixos valores de IC<sub>50</sub>.

Essa discussão permite explicar ainda, o potencial antioxidante superior ao da rutina, apresentado pelo óleo volátil de *E. benthamii* no ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico, o qual pode ser decorrente de reações do tipo redox. O óleo essencial de *E. benthamii* possui, quase que em sua totalidade, substâncias insaturadas que podem promover a redução do complexo fosfomolibdênico. Em contrapartida, revela apenas poucos constituintes com hidroxilas ácidas ou de natureza fenólica, o que dificulta a redução do radical livre DPPH e justifica a necessidade de 3,21 mg.mL<sup>-1</sup> de óleo volátil de *E. benthamii* para a redução de 50% desse radical livre. Especificamente para as essências de *Eucalyptus* spp., a literatura revela valores muito diferenciados de IC<sub>50</sub>, sendo que o resultado verificado para *E. benthamii* encontra-se dentro da faixa de variação estabelecida.

Jirovetz e colaboradores (2007), em estudo com o óleo volátil de *C. citriodora*, indicaram um valor de  $IC_{50}$  igual a  $344 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , quando da avaliação da atividade antioxidante por meio do ensaio de redução do DPPH. Nesse mesmo trabalho,  $14,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $4,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram observados como resultados de  $IC_{50}$  para a rutina e para o ácido ascórbico, respectivamente. Citronelal, citronelol e *neo*-isopulegol foram os principais constituintes identificados nesse óleo essencial.

Na análise do óleo essencial das folhas de *E. camaldulensis*, coletadas em diferentes períodos de tempo de áreas arborizadas da Tailândia, Siramon e Ohtani (2007) observaram valores de  $IC_{50}$  que variaram entre 1,75 e  $12,62 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Para as amostras que exibiram menores valores de  $IC_{50}$  e que, conseqüentemente, revelaram um maior potencial antioxidante, foram detectados elevados teores de *p*-cimeno (41,45 a 87,28%), grande variação na concentração de  $\gamma$ -terpineno (6,59 a 53,87%) e apenas traços de 1,8-cineol.

O óleo essencial de *Eucalyptus radiata* Sieber ex DC., em avaliação de sua capacidade antioxidante pelo método do radical livre DPPH, demonstrou valores de  $IC_{50}$  superiores a  $10000 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os constituintes majoritários verificados no óleo volátil dessa espécie foram o 1,8-cineol (69,53%), o  $\alpha$ -pineno (11,94%) e o *trans*-pinocarveol (4,81%) (HOUCINE, 2009).

Na investigação referente à composição química e à atividade antioxidante do óleo essencial obtido a partir de folhas jovens e de folhas decíduas (em estado senil) de *E. tereticormis*, foram observados valores de  $IC_{50}$  entre 110 e  $139,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disso, foram verificados constituintes químicos distintos nos óleos voláteis avaliados. As folhas jovens apresentaram em seu óleo volátil o 1,8-cineol e o  $\alpha$ -pineno, como constituintes predominantes, enquanto que as folhas senis indicaram o  $\beta$ -citronelal e o isopulegol como compostos principais (SINGH *et al.*, 2009).

### 5.3.2 Atividade antimicrobiana

Inicialmente, o óleo essencial de *E. benthamii* foi testado sem diluição prévia, por meio dos métodos de difusão em meio sólido utilizando cavidades e de difusão em disco. Como demonstrado nas Tabelas 12 e 13, o óleo essencial em estudo apresentou uma ação antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231), a

partir dos dois procedimentos efetuados. Para a cepa de *S. aureus*, foi observada uma elevada atividade antimicrobiana do óleo volátil de *E. benthamii*, com a formação de um halo médio de inibição igual ou superior a 40 mm, quando do ensaio pelo método de difusão em disco. Para *P. aeruginosa*, foi obtido um halo médio de inibição de 12,33 mm para o método de difusão em disco e de 10,33 mm para o método de difusão em meio sólido utilizando cavidades, sendo que esses valores foram superiores aos verificados para o controle positivo de cloranfenicol (8,33 e 8,00 mm, respectivamente).

TABELA 12 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, REFERENTES À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*, FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO CAVIDADES

| MICRORGANISMO                 | HALOS DE INIBIÇÃO (mm)                                |   |   |
|-------------------------------|---|---|---|
|                               | Óleo essencial<br>sem diluição<br>(50 $\mu\text{L}$ ) | Cloranfenicol<br>(30 $\mu\text{g}$ .50 $\mu\text{L}^{-1}$ ) | Cetoconazol<br>(50 $\mu\text{g}$ .50 $\mu\text{L}^{-1}$ ) |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 19,33 $\pm$ 1,15                                      | 11,67 $\pm$ 1,53  | -   |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 24,33 $\pm$ 1,15                                      | 14,67 $\pm$ 0,58  | -   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10,33 $\pm$ 0,58                                      | 8,00  | -   |
| <i>Escherichia coli</i>       | 14,00 $\pm$ 2,00                                      | 12,33 $\pm$ 0,58  | -   |
| <i>Candida albicans</i>       | 15,33 $\pm$ 2,88                                      | -   | 27,67 $\pm$ 2,12  |

(-): não testado

TABELA 13 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DECORRENTES DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*, FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

| MICRORGANISMO                 | HALOS DE INIBIÇÃO (mm)              |                       |                     |                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|                               | Óleo essencial sem diluição (20 µL) | Cloranfenicol (30 µg) | Gentamicina (30 µg) | Cetoconazol (50 µg) |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | ≥ 40,00                             | 29,00 ± 1,00          | 23,50 ± 1,29        | -                   |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 20,67 ± 1,15                        | 20,33 ± 1,15          | 20,75 ± 0,96        | -                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 12,33 ± 2,52                        | 8,33 ± 0,58           | 21,50 ± 0,58        | -                   |
| <i>Escherichia coli</i>       | 26,00 ± 1,73                        | 31,33 ± 1,53          | 22,25 ± 0,50        | -                   |
| <i>Candida albicans</i>       | 24,33 ± 1,15                        | -                     | -                   | 37,67 ± 2,08        |

(-): não testado

Para o método de difusão em disco, preliminarmente, foram aplicados 20 µL do óleo volátil para a impregnação dos discos estéreis. Porém, em decorrência dos valores dos halos de inibição terem sido bastante expressivos, em teste posterior, os discos estéreis foram impregnados com 5 µL do óleo essencial, para avaliação da possível diferença na inibição do crescimento dos microrganismos. Esses resultados estão expressos na Tabela 14.

TABELA 14 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, REFERENTES À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*, FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO EMPREGANDO UM VOLUME DE 5 µL

| MICRORGANISMO                 | HALOS DE INIBIÇÃO (mm)             |                       |                     |                     |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|                               | Óleo essencial sem diluição (5 µL) | Cloranfenicol (30 µg) | Gentamicina (30 µg) | Cetoconazol (50 µg) |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 15,67 ± 5,51                       | 29,00 ± 1,00          | 23,50 ± 1,29        | -                   |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 8,33 ± 0,58                        | 20,33 ± 1,15          | 20,75 ± 0,96        | -                   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9,00 ± 1,00                        | 8,33 ± 0,58           | 21,50 ± 0,58        | -                   |
| <i>Escherichia coli</i>       | 8,67 ± 1,15                        | 31,33 ± 1,53          | 22,25 ± 0,50        | -                   |
| <i>Candida albicans</i>       | 11,33 ± 1,52                       | -                     | -                   | 37,67 ± 2,08        |

(-): não testado

Nessas condições, também foram constatados halos médios de inibição superiores a 8 mm, indicando que o óleo volátil de *E. benthamii*, sem diluição e em volume reduzido, possui ação antimicrobiana frente aos microrganismos testados pelo método de difusão em disco.

A partir do método de difusão em disco, alguns ensaios adicionais foram realizados com a essência de *E. benthamii* diluída. Na Tabela 15, estão sumarizados os resultados da atividade antimicrobiana do óleo essencial em estudo, diluído nas concentrações de 500 mg.mL<sup>-1</sup> e de 250 mg.mL<sup>-1</sup>. Nesse caso, o óleo essencial diluído, quando da avaliação pelo método de difusão em disco, promoveu apenas a inibição do crescimento da cepa de *S. aureus*, resultando em valores de halo médio de inibição de 15,75 e 12,25 mm, respectivamente, para o óleo volátil a 500 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>.

TABELA 15 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, RELATIVOS À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DILUÍDO A 500 E 250 mg.mL<sup>-1</sup>, FRENTE AOS CONTROLES, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

| MICRORGANISMO        | HALOS DE INIBIÇÃO (mm)    |                         |                          |                        |                        |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                      | Óleo essencial<br>(20 µL) |                         | Cloranfenicol<br>(30 µg) | Gentamicina<br>(30 µg) | Cetoconazol<br>(50 µg) |
|                      | 500 mg.mL <sup>-1</sup>   | 250 mg.mL <sup>-1</sup> |                          |                        |                        |
| <i>S. aureus</i>     | 15,75 ± 2,87              | 12,25 ± 1,71            | 29,00 ± 1,00             | 23,50 ± 1,29           | -                      |
| <i>S. pyogenes</i>   | NI                        | NI                      | 20,33 ± 1,15             | 20,75 ± 0,96           | -                      |
| <i>P. aeruginosa</i> | NI                        | NI                      | 8,33 ± 0,58              | 21,50 ± 0,58           | -                      |
| <i>E. coli</i>       | NI                        | NI                      | 31,33 ± 1,53             | 22,25 ± 0,50           | -                      |
| <i>C. albicans</i>   | NI                        | NI                      | -                        | -                      | 37,67 ± 2,08           |

NI: não houve inibição do crescimento bacteriano

(-): não testado

Considerando a ausência de inibição do crescimento para a maioria das cepas, o experimento foi complementado unicamente para *S. aureus*. Foram testadas três novas diluições do óleo essencial de *E. benthamii* contra essa bactéria. Como ilustrado na Tabela 16, o óleo essencial de *E. benthamii* apresentou uma atividade antibacteriana contra *S. aureus* nas diluições de 100 e 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Entretanto, não foi verificado uma inibição do crescimento na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do óleo volátil.

TABELA 16 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO, REFERENTES À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* DILUÍDO A 50, 100 E  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , FRENTE A CEPA DE *Staphylococcus aureus* PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

| MICROORGANISMO               | HALOS DE INIBIÇÃO (mm)                |                                       |                                       |                                    |                                      |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|                              | Óleo essencial<br>(20 $\mu\text{L}$ ) | Óleo essencial<br>(20 $\mu\text{L}$ ) | Óleo essencial<br>(20 $\mu\text{L}$ ) | Gentamicina<br>(30 $\mu\text{g}$ ) | Cloranfenicol<br>(30 $\mu\text{g}$ ) |
|                              | (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )           | (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )          | (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )          |                                    |                                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | NI                                    | 11, 67 $\pm$ 2,08                     | 13,33 $\pm$ 2,31                      | 23,50 $\pm$ 1,29                   | 29,00 $\pm$ 1,00                     |

NI: não houve inibição do crescimento bacteriano

Dessa forma, o óleo essencial puro de *E. benthamii* revelou uma ação antimicrobiana contra todas as cepas examinadas. Porém, quando da análise do óleo volátil diluído, foi constatada uma inibição apenas sobre o crescimento microbiológico de *S. aureus*.

Diversos estudos sobre a ação antimicrobiana de óleos essenciais têm sido descritos na literatura, a partir de diferentes métodos experimentais e com resultados muito variáveis (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados evidenciados para *E. benthamii* condizem com os trabalhos envolvendo outras espécies do gênero.

Em estudo com *E. cinerea*, Franco e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial dessa espécie, pelo método de difusão em disco. Os autores verificaram um potencial antimicrobiano frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Para a cepa de *P. aeruginosa*, foi visualizado um halo médio de inibição de 9 mm para o óleo essencial não diluído de *E. cinerea*, sendo que esse valor é muito semelhante ao determinado para o óleo volátil de *E. benthamii* no presente trabalho.

Estanislau *et al.* (2001), na análise da composição química e da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae, concluíram que as essências de *C. citriodora* e *E. grandis* apresentam um maior efeito inibitório contra as bactérias Gram-negativas.

O estudo da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e de *E. globulus*, realizado por Mounchid *et al.* (2005), demonstrou que cepas de *E. coli*, isoladas de amostras de urina e resistentes a maioria dos antibióticos, foram suscetíveis a ação do óleo volátil de eucalipto. Os autores sugeriram que essa essência pode ser usada na indústria farmacêutica, para a produção de novos medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas.

Leite *et al.* (2007) conduziram uma investigação, com o propósito de avaliar o efeito do eugenol, do  $\beta$ -pineno e do  $\alpha$ -pineno em inibir o crescimento de cepas de bactérias Gram-positivas, potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. Foi verificado, por meio da concentração inibitória mínima e pelo método de difusão em meio sólido, que os fitoconstituintes ensaiados inibiram o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas.

Ao avaliarem a composição química e o desempenho antimicrobiano do óleo essencial de *E. tereticormis*, Alitonou e colaboradores (2004) observaram que o óleo volátil dessa espécie possui como composto majoritário o *p*-cimeno (31,14%), sendo apenas 5,35% de 1,8-cineol, e exibe atividade antimicrobiana.

Oyedeji *et al.* (1999), analisaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Eucalyptus alba* Reinw. ex Blume, *E. camaldulensis* var. *catharine*, *E. camaldulensis* var. *mysore*, *Eucalyptus deglupta* Blume e *E. saligna*, na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> por meio do teste de difusão em disco. Os óleos voláteis das cinco espécies de *Eucalyptus* indicaram uma considerável atividade antibacteriana frente às bactérias Gram-positivas e às Gram-negativas, além de atividade antifúngica contra a *C. albicans*. Também, os autores destacaram que as espécies que apresentaram os maiores halos de inibição tinham o 1,8-cineol como constituinte majoritário de seus óleos essenciais.

Em estudo referente à atividade antimicrobiana de óleos voláteis, pesquisadores verificaram que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais testados foi resultante de um efeito combinado, relacionado à presença de diferentes compostos (BOSNIC; SOFTIC; VASIC, 2006).



Nesse sentido, foi realizada uma investigação relativa aos efeitos dos óleos essenciais brutos e das frações de *Anethum graveolens* L., de *Coryandrum sativum* L. e de *Eucalyptus dives* Schauer frente a alguns microrganismos. Foi observada uma inibição a partir das frações que, em alguns casos, superaram a do óleo essencial bruto (DELAQUIS *et al.*, 2002). Isso pode estar relacionado ao fato de que existem interações entre os constituintes e que essas podem resultar em efeitos sinérgicos ou, até mesmo, antagonistas (DAVIDSON; PARISH, 1989).

Por fim, segundo Cowan (1999), o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana dos compostos terpênicos, principais constituintes dos óleos voláteis, não está completamente elucidado. Há indícios de que os compostos terpênicos podem promover o rompimento da membrana plasmática de microrganismos, acarretando a sua morte.

Ponderando as informações relatadas nos trabalhos prévios, é possível afirmar que os resultados obtidos para o óleo essencial de *E. benthamii*, referentes à atividade antimicrobiana, são compatíveis com os dados descritos para esse gênero. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos de interações entre os constituintes dos óleos essenciais e dessa forma, não se podem afirmar quais compostos presentes no óleo essencial da espécie em investigação colaboraram para a ação antimicrobiana evidenciada.

### 5.3.3 Atividade biológica contra *Pediculus humanus capitis*

Infestações por *Pediculus humanus capitis* tem sido consideradas um problema mundial, afetando, principalmente, crianças nos primeiros estágios escolares, tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento. Durante décadas, o controle dessas parasitose tem sido realizado com a aplicação contínua e repetitiva de inseticidas, como os piretróides. Porém, o uso contínuo dessas substâncias tem levado ao desenvolvimento de processos de resistência. Por outro lado, o emprego de substâncias fitoquímicas, como os óleos essenciais, tem se tornado de grande interesse, em virtude de seus efeitos repelentes, ovicidas e inseticidas contra várias espécies da classe Insecta, incluindo os piolhos-da-cabeça (AUDINO *et al.*, 2007; LEE; PETERSON; COATS, 2003; ISMAN, 1999).

O óleo essencial de *E. benthamii* foi avaliado quanto às propriedades de repelência e de fumegância frente a machos e fêmeas de *Pediculus humanus capitis*, coletados de voluntários de duas instituições da cidade de Ponta Grossa.

Conforme o visualizado na Tabela 17 e na Figura 34, o índice de repelência (IR) do óleo essencial de *E. benthamii* foi de 35,03%, sendo estatisticamente semelhante ( $p > 0,05$ ) ao obtido para o óleo essencial de citronela, empregado como controle positivo. Para o controle negativo, realizado preliminarmente e com a impregnação somente de acetona, foi verificado que  $72,89 \pm 10,77\%$  dos piolhos se moveram para a zona b, permanecendo em contato direto com essa região.

TABELA 17 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* CONTRA O *Pediculus humanus capitis*

| AMOSTRA                               | ATIVIDADE REPELENTE<br>IR $\pm$ DP (%) | ATIVIDADE FUMEGANTE<br>KT <sub>50</sub> $\pm$ DP (min) |
|---------------------------------------|--|--|
| Óleo essencial de <i>E. benthamii</i> | 35,03 $\pm$ 13,13*                     | 36,67 $\pm$ 2,89**                                     |
| Óleo essencial de citronela           | 36,13 $\pm$ 20,30*                     | NT   |
| Óleo essencial de <i>Melaleuca</i>    | NT                                     | 22,5 $\pm$ 3,54**                                      |

NT: não testado

\* teste *t*: resultados estatisticamente iguais ( $p = 0,95$ )

\*\* teste *t*: resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Os resultados do ensaio de fumegância estão expressos na Tabela 17, como tempo médio de *knock-down* (KT<sub>50</sub>), indicando o tempo em que 50% dos piolhos foram irreversivelmente atingidos pelos vapores da essência de *E. benthamii* e demonstram inabilidade em caminhar pelo papel de filtro. Durante o experimento (Figura 35), foi verificado que, após 27 min de exposição aos vapores do óleo essencial em estudo, os piolhos começaram a apresentar sinais de perda da orientação espacial. Dessa forma, foi observada uma inatividade de 50% dos insetos (KT<sub>50</sub>) após 36,67 min de exposição aos vapores do óleo volátil de *E. benthamii*, enquanto que para o óleo essencial de *Melaleuca*, utilizado como controle positivo, foi obtido um KT<sub>50</sub> de 22,5 min.

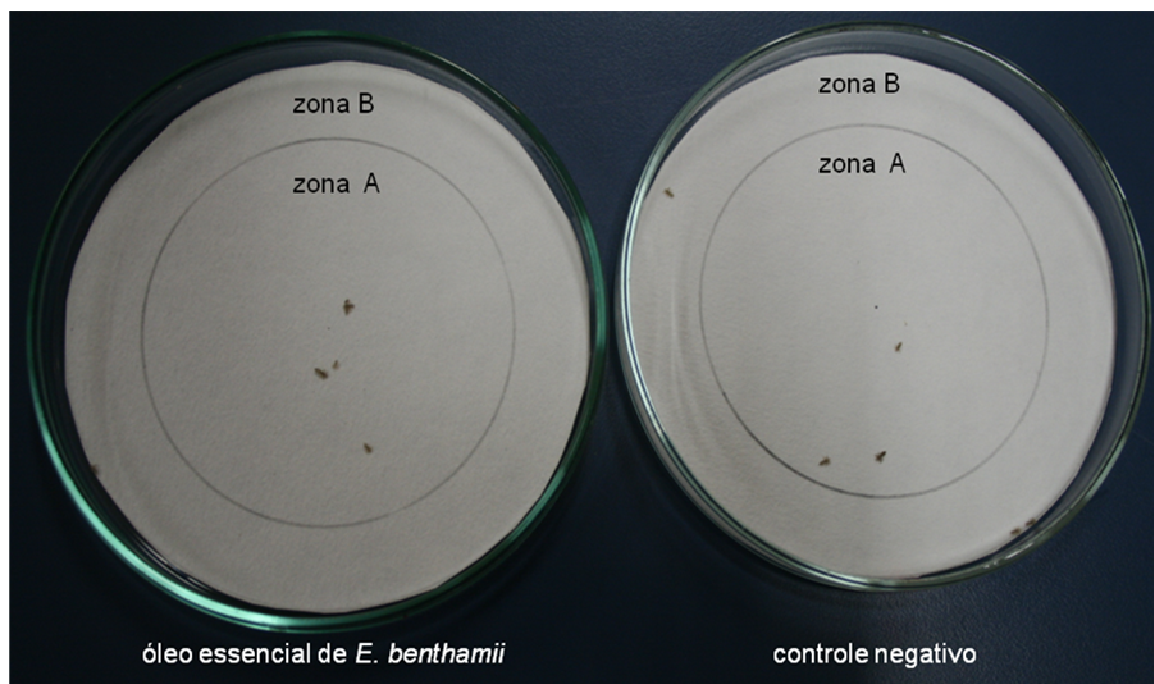


FIGURA 34 - ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*, DEMONSTRANDO OS PIOLHOS EVITANDO A ZONA TRATADA (ZONA B)



FIGURA 35 - ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUMEGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii*

Yang *et al.* (2004) avaliaram a atividade inseticida do óleo essencial de 54 espécies vegetais contra as fêmeas de *Pediculus humanus capitis*, utilizando os métodos de contato direto e de atividade fumegante. Um dos óleos voláteis pesquisados foi obtido a partir das folhas de *E. globulus*, o qual demonstrou uma excelente atividade fumegante, com valor de  $KT_{50}$  igual a 6,2 min.

Em investigação da propriedade repelente e do efeito fumegante de 16 óleos essenciais de espécies nativas e exóticas da Argentina contra *Pediculus humanus capitis* resistentes a permetrina, Toloza *et al.* (2006) observaram que os óleos voláteis de *E. cinerea*, *E. viminalis* e *E. saligna* foram os que apresentaram os melhores resultados quando da avaliação da atividade fumegante, com valores de  $KT_{50}$  de 12,0; 14,9 e 17,4 min, respectivamente.

Toloza e colaboradores (2008) realizaram um estudo referente a hibridização interespecífica de espécies do gênero *Eucalyptus*, como ferramenta para aumentar a bioatividade dos óleos essenciais contra os piolhos resistentes a permetrina. Nessa investigação, os óleos voláteis de *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticormis* e dos híbridos *E. grandis* x *E. camaldulensis* e *E. grandis* x *E. teretircormis*, foram avaliados pela atividade fumegante e pelo efeito repelente, frente a piolhos permetrina-resistentes. A atividade fumegante apresentada pelas espécies híbridas foi superior a das demais espécies, com valores de  $KT_{50}$  entre 12,99 e 13,63 min. Para a atividade repelente, o IR variou entre  $47,80 \pm 16\%$  e  $80,69 \pm 6\%$  para os cinco óleos essenciais investigados.

Estudos referentes à efetividade de loções capilares a base de óleos essenciais também têm sido conduzidos. Audino *et al.* (2007) constatou que a combinação a 10% do óleo essencial de *E. globulus* e do óleo essencial de *Mentha x piperita* L., em solução de etanol a 96%, foi tão efetivo contra os piolhos resistentes à permetrina, quanto a melhor preparação comercial disponível na Argentina.

Gallardo, Mougabure Cueto e Picollo (2009) verificaram que os monoterpenóides 1,8-cineol, linalol e pulegona são ativos contra o *Pediculus humanus capitis* e o *Pediculus humanus humanus*.

Em investigação acerca da atividade tóxica de 23 monoterpenos contra os ovos (lêndeas) de piolhos resistentes à permetrina, Toloza e colaboradores (2006) verificaram que os compostos mais eficazes foram pertencentes à classe química dos éteres, seguidos por cetonas, alcoóis, fenóis e estéres.

Na avaliação da atividade ovicida e do efeito adulticida dos constituintes do óleo essencial de *Origanum majorana* L. contra os piolhos resistentes a inseticidas, foi verificado que o 1,8-cineol, seguido do linalol, foram os compostos mais tóxicos, que revelaram os melhores resultados, inclusive superiores aos inseticidas sintéticos D-fenotrina e piretro (YANG *et al.*, 2004).

De acordo com Daley (2007), vários constituintes do óleo essencial de *E. globulus* têm efeitos letais contra espécimes de *Pediculus humanus capitis* e seus ovos. O 1,8-cineol é considerado duas vezes mais eficaz que a D-fenotrina e o piretro, enquanto o (-)- $\alpha$ -pineno, o 2- $\beta$ -pineno e o (*E*)-pinocarveol são tão ativos quanto esses compostos sintéticos.

É possível citar ainda, como alguns dos compostos voláteis que possuem ação tanto sobre os ovos, quanto sobre a fase adulta do piolho-da-cabeça, o eugenol, o salicilato de metila, o  $\alpha$  e o  $\beta$ -pineno, o (*E*)-pinocarveol, o  $\gamma$ -terpineno, o  $\alpha$ -terpineol, o benzaldeído, o linalol, o cinamaldeído e o salicilaldeído (YANG *et al.*, 2004).

Dessa forma, a partir desses resultados *in vitro*, e considerando as informações descritas na literatura, especialmente as que relacionam a presença de  $\alpha$ -pineno com possíveis propriedades pediculicidas, é possível afirmar que o óleo essencial de *E. benthamii* apresenta uso potencial para o controle de infestações causadas pelo piolho-da-cabeça.

## 6 CONCLUSÃO

As características morfoanatômicas de folhas alternas, lanceoladas, estômatos anomocíticos em ambas as faces, ausência de tricomas, mesofilo heterogêneo simétrico isobilateral, nervura mediana plano-convexa com sistema vascular do tipo bicolateral em arco aberto, ocorrência de idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio, presença de cavidades secretoras com conteúdo lipofílico e existência de súber cicatricial, quando analisadas em conjunto, permitem a identificação farmacognóstica das folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden *et* Cabbage.

Com relação à composição fitoquímica, na qual foi evidenciada a presença de triterpenos e/ou esteróides, glicosídeos flavônicos, glicosídeos saponínicos, taninos, ácidos fixos, ácidos voláteis, aminogrupos e leucoantocianidinas, esses metabólitos vegetais condizem com os relatos verificados para outras espécies de *Eucalyptus*.

Valores de rendimento satisfatórios e sem diferença expressiva entre as coletas de outono e primavera foram observados para as amostras de óleo essencial de *E. benthamii*, obtidas por hidrodestilação.

A partir das análises de cromatografia gasosa acoplada a detector de massas, o  $\alpha$ -pineno foi quantificado como o componente majoritário para ambas as coletas. O 1,8-cineol, geralmente observado em espécies de *Eucalyptus*, foi apenas detectado em quantidades-traço.

O óleo essencial de *E. benthamii* demonstrou atividade biológica, com efeito antioxidante pelo método do fosfomolibdênio e com valor superior ao apurado para o flavonóide rutina, além de potencial antimicrobiano frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e à levedura *Candida albicans*, sendo que em diluição foi eficaz frente a cepa de *Staphylococcus aureus*.

Contra o *Pediculus humanus capitis*, o óleo essencial de *E. benthamii* apresentou atividade fumegante e ação repelente, revelando uma potencial aplicação em produtos farmacêuticos piolhicidas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGRONLINE. Pesquisa amplia estudos com espécies de eucaliptos resistentes às geadas. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=1578>> Acesso em: 14 de dez. 2008.
- ALITONOU, G.; AVLESSI, F.; WOTTO, V. D.; AHOUSSE, E.; DANGOU, J.; SOHOUNHLOUÉ, D. C. K. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 1051-1055, 2004.
- ALMEIDA, L. P.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; SANTIAGO, M. F. Biotransformação do 1,8-cineol por bactérias livres e imobilizadas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2005.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998.
- ALVES, E. S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E. L. Análise estrutural das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 241-248, 2008.
- AMMON, D. G.; CLARKE, D. A.; TJANDRA, J. Rapid and accurate chemical determination of terpenes in leaves of *Eucalyptus* species. **Analyst**, v. 110, p. 921-924, 1985.
- ANDRADE, E. N.; VECCHI, O. **Os eucaliptos**: sua cultura e exploração. São Paulo: Typographia Brazil de Rothschild & Comp., 1918.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- AUDINO, P. G.; VASSENA, C.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. Effectiveness of lotions based on essential oils from aromatic plants against permethrin resistant *Pediculus humanus capitis*. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, p. 389-392, 2007.
- BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 226-231, 2009.
- BALACS, T. Cineole-Rich Eucalyptus. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 8, n. 2, p. 15-21, 1997.

BAPTISTA DA SILVA, L. D. S. A. **Anatomia foliar e taxa de herbivoria em *Psidium cattleyanum* Sab. (Myrtaceae)**. Florianópolis, 2002, 95 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Santa Catarina.

BARBOSA, J. V.; PINTO, Z. T. Pediculose no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 579-586, 2003.

BARTON, A. F. M.; TJANDRA, J.; NICHOLAS, P. G. Chemical evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1253-1257, 1989.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, S. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Iowa University, 1976.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1959, 1958.

BOSNIC, T.; SOFTIC, D.; VASIC, J. G. Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. **Acta Medica Academica**, v. 35, p. 19-22, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretária de Vigilância Sanitária. Resolução 104/99, de 26/04/1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 14/05/99, 1999.

BRATTSTEN, L. B. Cytochrome P-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores. In: DUNKEL, F. V.; SEARS, L. J. Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. *vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

BRITO, J. F. A.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol metacrilate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.

BROOKER, I. Botany of the eucalypts. In: COOPER, J. J. W. **Eucalyptus: The Genus *Eucalyptus***. London: Taylor & Francis, 2002, p. 3-35.

BROPHY, J. J.; SOUTHWELL, I. A. Eucalyptus chemistry. In: COOPER, J. J. W. **Eucalyptus: The Genus *Eucalyptus***. London: Taylor & Francis, 2002, p. 102-160.



CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CERPELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of *Eucalyptus* essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology**, v. 56, p. 89-92, 2008.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHENG, S. S.; HUANG, C. G.; CHEN, Y. J.; YU, J. J.; CHEN, W. J.; CHANG, S. T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 452-256, 2009.

CLEELAND, R.; SQUIRES E. Evaluation of new antimicrobials "in vitro" and in experimental animal infections *In*: Lorian V. (ed.) **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991, p. 739-787.

COMMONWEALTH OF AUSTRALIA. **Forest trees of Australia**. 2. ed. Canberra: Commonwealth Government Printer, 1962.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; LOGGIA, R. D. J. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 144-151, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v. 1.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

COUTINHO, J. L. B.; SANTOS, V. F.; FERREIRA, R. L. C.; NASCIMENTO, J. C. B. Avaliação do comportamento de espécies de *Eucalyptus* spp. na zona da mata pernambucana. I: resultados do primeiro ano – 2001. **Sociedade de Investigações Florestais**, v. 28, n. 6, p. 771-775, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2005.

DALEY, J. Head Lice. **The Journal of Complementary Medicine**, p. 22-29, jan/fev, 2007.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of antimicrobials. **Food Technology**, v. 52, p. 148-154, 1989.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and *Eucalyptus* essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DIXON, R. A. Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. **Phytochemistry**, v. 57, p. 145-148, 2001.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.

DORMAN H. J. D.; DEANS S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DORMAN, H. J. D.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; DEANS, S. G. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 12-16, 2000.

DOROSO, N. B.; BARBOLA, I. F.; BUSCH, O. M. S.; KOVALICZN, R. A.; MEYER, W. J. Prevalência de pediculose em crianças de creches municipais de Ponta Grossa/PR. In: I Seminário do Mercosul sobre Pediculose, Escabiose e Tungíase: seus problemas e cuidados, 2004, São Leopoldo. **Resumos**. p. 82.

ENGLER, A. **Syllabus der pflanzenfamilien**. Berlin : Gebruder, 1964.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

EVANS, W.C. **Farmacognosia Trease y Evans**. México: Interamericana McGraw-Hill, 1989.

FABROWSKI, F.J.. *Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil. Curitiba, 2002, 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 657-683.

FARMACOPEIA Brasileira. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Parte II.

FARNSWORTH, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 3, p. 225-276, 1966.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multi-ciência**: construindo a história dos produtos naturais, v. 7, out., 2006.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 191-194, 2005.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., Myrtaceae**. Curitiba, 2005, 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

GALLARDO, A.; MOUGABURE CUETO, G.; PICOLLO, M. I. *Pediculus humanus capitis* (head lice) and *Pediculus humanus humanus* (body lice): response to laboratory temperature and humidity and susceptibility to monoterpenoids. **Parasitologia Research**, v. 105, p. 163-167, 2009.

GRESSLER, E.; PIZO M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUENTHER, E. Individual essential oils of the plant family Myrtaceae. In: **The essential oils**, 4. ed. New York: Van Nostrand, 1977. v.4.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 13-28.

GUERRA FILHO, S. S.; FANAN, S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 6, n. 2, p. 51-54, 1994.

HADDAD, A. Obtenção e coloração de cortes semifinos. *In*: SOUZA, W., HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; PADRÓN, T. S. (eds.) **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de microscopia eletrônica, 1989.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods**: A guide to modern techniques of plant analysis, 3. ed., London: Chapman & Hall Pub, 1998.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins**. New York: Academic Press, 1966.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. *In*: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, 1ª ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007, p. 211-235.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Comunicado Técnico** 100, Embrapa Florestas, 2003.

HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 38, p. 121-123, 1999.

HIGA, A. R.; CARVALHO, P. E. R. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. *In*: Congresso Florestal Brasileiro, 1990, Campos do Jordão. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura/Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, v. 3, p. 459-462, 1990.

HOUCINE, B. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 8, p. 1292-1297, 2009.

ISMAN, M. Pesticides based on plant essential oils. **Pestic Outlook**, v. 10, p. 68-72, 1999.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta Medica**, v. 53, p. 395-398, 1987.

JIROVETZ, L.; BAIL, S.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; STANCHEV, V.; SCHMIDT, E. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of the leaf essential oil of *Corymbia citriodora* (Hook) from China. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 5, p. 599-606, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOHNSON, E. D. A comparison of the juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 25, p. 202-212, 1926.

JOLY, B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JOVANOVIC, T.; BOOTH, T. H. Improved species climatic profiles. **RIRDC Publication**, n. 02/095, 2002.

KISKÓ, G.; ROLLER, S. Carvacrol and *p*-cymene inactivate *Escherichia coli* O 157:H7 in apple juice. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 36-44, 2005.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; WEIS, N.; WEIGAND, H. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119–128, 1989.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. N.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. Antimicrobial susceptibility testing. *In*: **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5. ed. Philadelphia – New York: Lippincott, 1997, p. 398-408.

KUKLINSKI, C. **Farmacognosia**: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Ediciones Omega, 2000.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, 537-556.

LEE, S.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 77-85, 2003.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LIMA, E. A. *Eucalyptus benthamii* – uma alternativa energética para áreas de ocorrência de geadas severas. **Painel Florestal**. Disponível em: < [http://painelflorestal.com.br/exibeNews.php?id=410&cod\\_editoria=4&url\\_back=news.php&pag=0&busca=>](http://painelflorestal.com.br/exibeNews.php?id=410&cod_editoria=4&url_back=news.php&pag=0&busca=>) Acesso em: 20 de jul. 2009.

LIMA, E. O.; GUERRA, M. F. L.; SILVA, M. G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 81, n.3-4, p. 95-97, 2000.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. S.; HENRIQUES, A. T. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, p. 49-52, 1998.

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Yield, chemical composition and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. **Entomologia experimentalis et Applicata**, v. 129, p. 107-114, 2008.

LUQUE, R.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcão 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 199-211, 1996.

MATSINGOU, T. C.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLU, A. *In vitro* antioxidant activity of Black tea and mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1060-1065, 2000.

MEDEIROS, J. D. Anatomia foliar de *Eugenia umbelliflora* Berg. (Myrtaceae). **Biotemas**, v. 13, n. 1, p. 7-20, 2000.

MERCK CD. **The merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologics, 13 ed., Merck & Co., Rahway, on CD-ROM Version, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950, v. 2.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MORI, F. A. **Caracterização parcial dos taninos da casca e dos adesivos de três espécies de *E. grandis***. Viçosa, 2000, 73 p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa.

MOUNCHID, K.; BOURJILAT, F.; DERSI, N.; ABOUSSAOUIRA, T.; RACHIDAI, A.; TANTAOU-ELARAKI, A.; ALAOU-ISMALI, M. The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globulus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 10, p. 1175-1176, 2005.

MOURA, V. P. G. **Avaliação de espécies de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo**: resultados parciais. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1980.

MUMCUOGLU, K. Y.; MILLER, J.; ZAMIR, C.; ZENTNER, G.; HELBIN, V.; INGBER, A. The *in vivo* pediculicidal efficacy of a natural remedy. **The Israel Medical Association Journal**, v. 4, n. 10, p. 790-793, 2002.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. F.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NAVARRO, V.; VILLAREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOYOLA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infections diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 143-147, 1996.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. *In*: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V.

**Ciências Farmacêuticas:** contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003, p.9-56.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B.; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciência Florestal**, v. 8, n. 1, p.67-76, 1998.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998, p. 78-79.

OYEDEJI, A. O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O. N.; ADENIYI, B. A.; KOENIG, W. A. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v. 70, p. 526-528, 1999.

PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae Jussieu). **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 29-36, 2003.

PAULA, J. A. M.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; PAULA, J. R. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; RIBAS, J. L. C.; SPINARDI, G. M. S.; DÖLL, P. M.; ARTONI, R. F.; ZAWADZKI, S. F. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* Benth. essential oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 846-851, 2007.

PHARMACOPEA Helvetica. 7. ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1993.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos essenciais**. Viçosa: CPT, manual n. 463, 2003.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998a.

PRATES, H. T.; SANTOS, J. P.; WAQUIL, J. M.; FABRIS, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; FOSTER, J. E. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 243-249, 1998b.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRYOR, L. D. **Australian endangered species: *Eucalyptus***. Canberra: Commonwealth of Australia, 1981.

ROBBERS, J. E.; SPEEDLE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROESER, K. R. Nadel der Schwarzkiefer. Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; SOUZA, J. A.; ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2003.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 615-656.

SANTOS, S. C.; WATERMAN, P. G. Polyphenols from *Eucalyptus consideriana* and *Eucalyptus viminalis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 95-97, 2001a.

\_\_\_\_\_. Polyphenols from *Eucalyptus ovata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 316-318, 2001b.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 231-233, 2007.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Iowa: State College Press, 1951.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p.711-740.

SCHUMACHER, M. V.; CALIL, F. N.; VOGEL, H. L. M. **Silvicultura aplicada**. Santa Maria: UFSM, 2005.



SEFIDKON, F.; BAHMANZADEGAN, A.; ASSAREH, M. H. Effect of distillation methods and harvesting times on the essential oil and cineole content of *Eucalyptus dealbata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 2, p. 250-253, 2008.

SIDDIQUI, B. S.; SULTANA, S.; BEGUM, S. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata* leaves **Phytochemistry** v. 54, n. 8, p. 861-865, 2000.

SILVA, P. H. M.; BRITO, J. O.; SILVA JÚNIOR, F. G. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DELMOND, B.; FILLIATRE, C.; BOURGEOIS, G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 1, p. 27-33, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 387-415.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007.

SINGH, H. P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticormis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6962-6966, 2009.

SIRAMON, P.; OHTANI, Y. Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. **The Japan Wood Research Society**, v. 53, p. 498-504, 2007.

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Unisinos, 2003.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany**. Oxford: Clarendon Press, 1908, v. 2.

SOUZA, F. A.; SENA, J.; MARANHO, L. T.; OLIVEIRA, C. M. R.; GUIMARAES, A. T. B. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium letidophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p. 24-27, 2008.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

STORER, T. I.; USIN KUKENTHAL GER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**, 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

TOLOZA, A. C.; LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H.; PICOLLO, M. I. Interspecific hybridization of *Eucalyptus* as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7341-7347, 2008.

TOLOZA, A. C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G. M.; BIURRUN, F.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal Of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 889-895, 2006.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549-554, 2005.

TUFFI-SANTOS, L. D.; THADEO, M.; IAREMA, L.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A. (2008) Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus* Revista Árvore, v. 32, p. 769-779, 2008.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.

USP XXVIII (UNITED STATES PHARMACOPEIA). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O.; PIMENTA, A. S.; LUCIA, R. M. D. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. **Revista Árvore**, v. 28, n. 4, p. 571-582, 2004.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo: USP/ESALQ, Documentos Florestais n. 17, p. 1-26, 2003.

\_\_\_\_\_. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. **Cientia Forestalis**, n. 56, p. 145-154, 1999.

VOEGELI, R.; MEIER, J.; DOPPLER, S.; RIES, P. Defesa contra espécies reativas de oxigênio: modelos *in vitro*. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 4, n. 5, p. 49-55, 1992.

WILKINSON, H. P. The plant surface (mainly leaf) part VII: epicuticular wax and its morphology. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Claredon Press, v. 1, 1979, p. 158-161.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.

R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 577-614.

YANG, Y. C.; LEE, H. S.; CLARK, J. M.; AHN, I. J. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2507-2511, 2004.

## APÊNDICES

|   |     |
|---|-----|
| <b>Apêndice 1</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....   | 111 |
| <b>Apêndice 2</b> – Espectros de massa do óleo essencial de <i>E. benthamii</i> referentes a coleta de outono.....    | 112 |
| <b>Apêndice 3</b> – Espectros de massa do óleo essencial de <i>E. benthamii</i> referentes a coleta de primavera..... | 126 |

## APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA PARA SUBMETTER-SE À RETIRADA DE PIOLHOS

PROJETO DE PESQUISA: **AVALIAÇÃO INSETICIDA *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage (Myrtaceae) CONTRA *Pediculus humanus capitis* De Geer**

Nome:.....Sexo:.....

Idade:.....RG:.....Tel.....

Endereço residencial:.....

Nome dos pais ou responsável:.....

RG do pai ou responsável:.....

**Justificativa e os Objetivos da pesquisa:** você está sendo convidado a participar de uma das etapas da pesquisa que pretende avaliar a ação do óleo que existe em folhas de eucalipto, contra o piolho humano. Esse tipo de folhas de eucalipto do estudo vem sendo cultivada em plantios experimentais, especialmente no sul do Brasil. Visando o aproveitamento de suas folhas, estamos investigando suas possíveis propriedades medicinais.

**Descrição dos procedimentos:** você participará do projeto única e exclusivamente permitindo que um pesquisador observe se há ou não piolhos na sua cabeça. Se houver, eles serão retirados um a um, manualmente pelo pesquisador. Essa coleta de piolhos vivos não causará dor e será realizada de forma individual, em ambiente isolado, e se o participante for menor de idade, estará acompanhado da Assistente Social de Instituição que frequenta, dos pais ou outro responsável. Também não divulgaremos sua identidade como participante da pesquisa e, em caso positivo para piolhos, você ou o responsável será informado para fins de tratamento.

**Transtornos:** poderá haver algum constrangimento (vergonha) na retirada dos piolhos. Caso isso ocorra você poderá deixar de participar da pesquisa a qualquer momento.

**Os benefícios esperados:** investigando-se os casos positivos para pediculose, serão retiradas as formas vivas infestantes, contribuindo para acabar com os sintomas e consequências da doença e também reduzir a população de piolhos. Haverá orientação sobre cuidados e prevenção, ressaltando-se a importância da catação manual de piolhos como rotina diária para combater os piolhos. Quando se tratar de menor de idade, será comunicado o responsável para encaminhamento para tratamento.

**IMPORTANTE!** Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento poderá deixar de participar da pesquisa e retirar esse termo de consentimento, sem que haja qualquer prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a Instituição UEPG. Mantém-se o sigilo e o caráter confidencial do trabalho sem expor sua identidade. Qualquer despesa eventual será custeada pela equipe de pesquisadores. Em caso de necessidade, entrar em contato com a Pesquisadora Responsável (Rosilda Aparecida Kovaliczn – RG: 1429906-PR - ENDEREÇO – Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Lab. 32 tel.: (42) 32203129) ou com a Comissão de Ética em Pesquisa (COEP/UEPG – Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, tel.: (42) 32203108).

**Pesquisador principal, responsável pelo Projeto:**.....

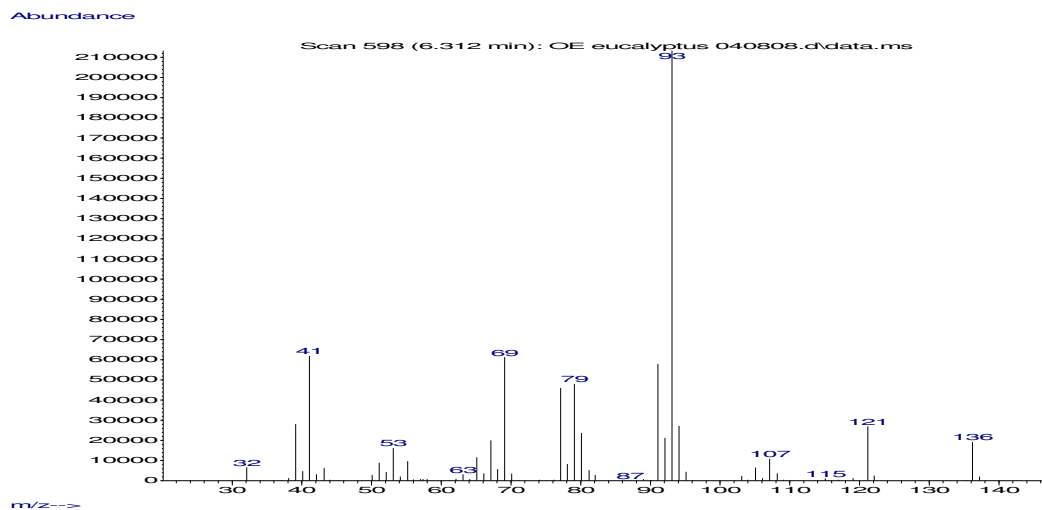
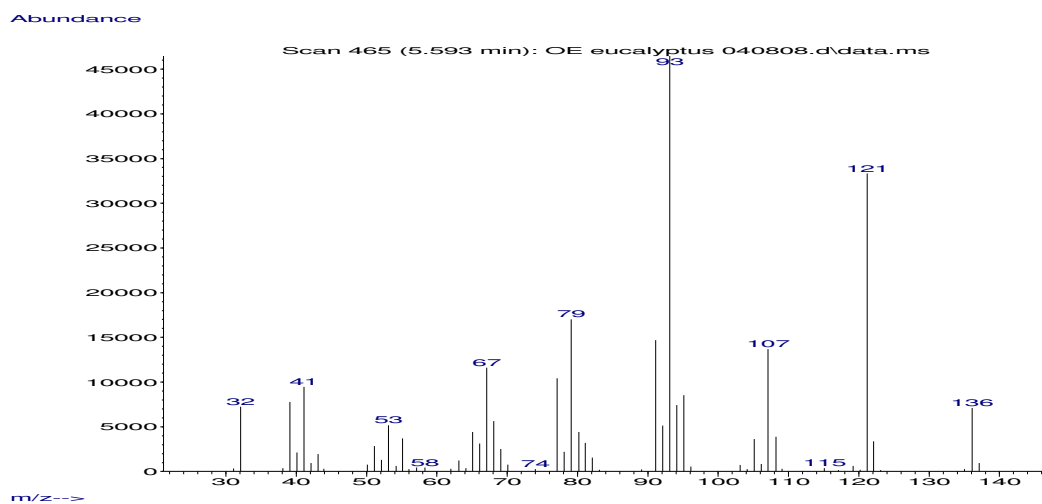
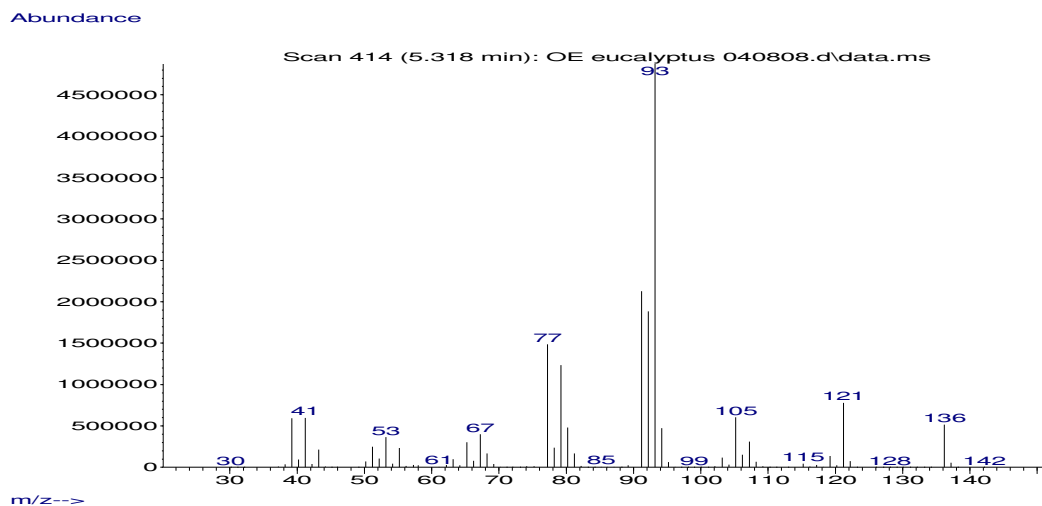
**RG: 1429906-PR (Tel. 3220-3129) (Prof.ª. M.Sc. Rosilda Aparecida Kovaliczn)**

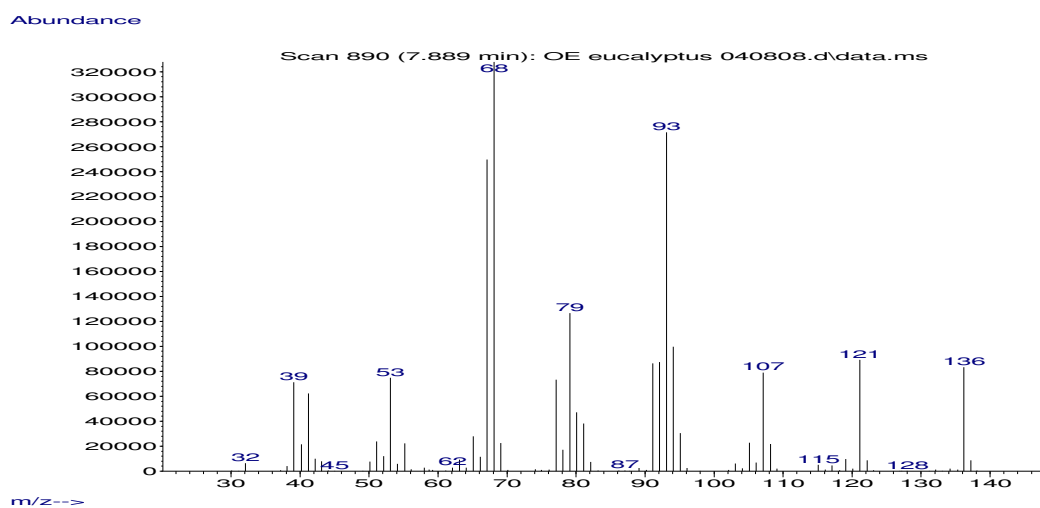
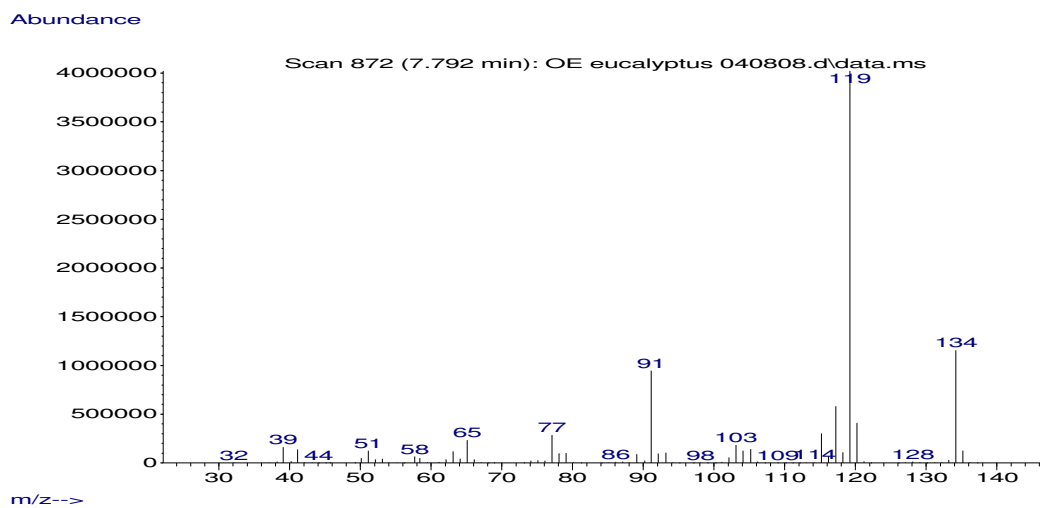
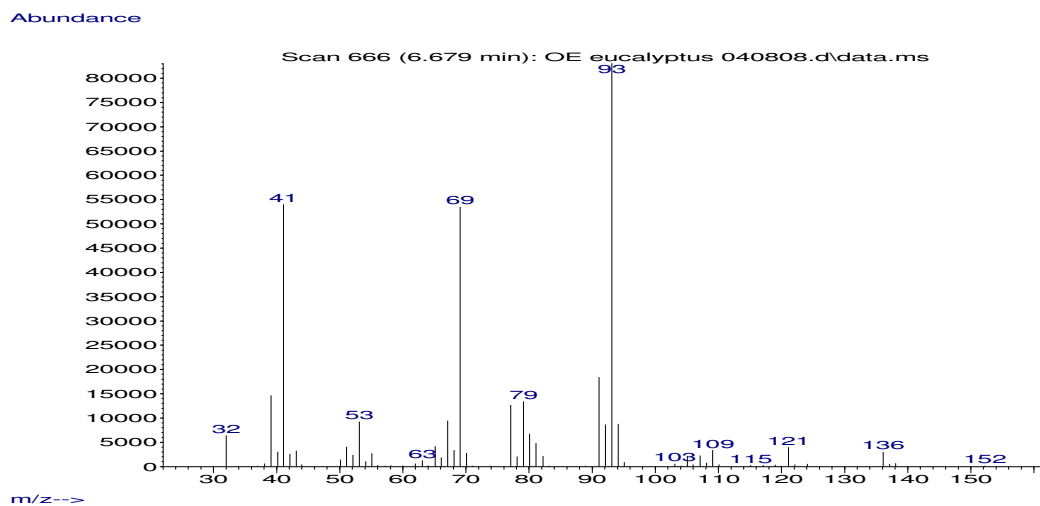
.....  
**Concordo/autorizo a participação na pesquisa**  
**Sujeito da pesquisa**

**Ponta Grossa, / /**

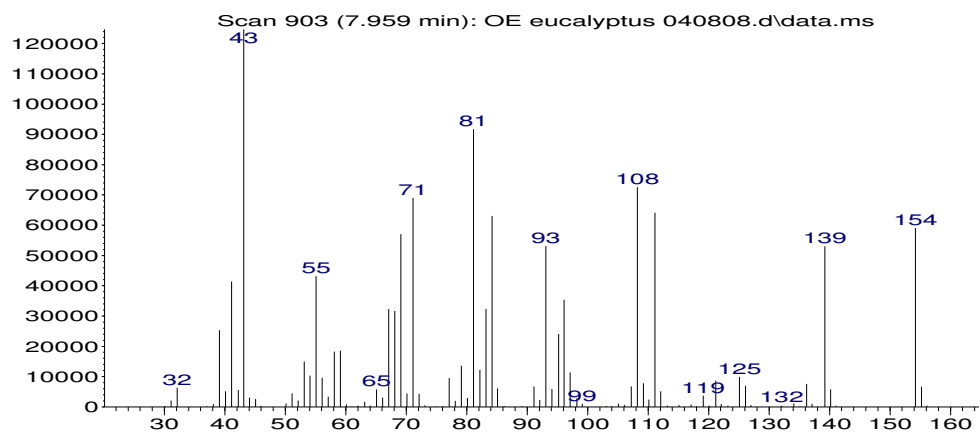
**Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG (COEP/UEPG)**  
**Av. Carlos Cavalcanti, 4748 Bloco M Tel: 3220-3108**

## APÊNDICE 2 – ESPECTROS DE MASSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii* REFERENTES A COLETA DE OUTONO



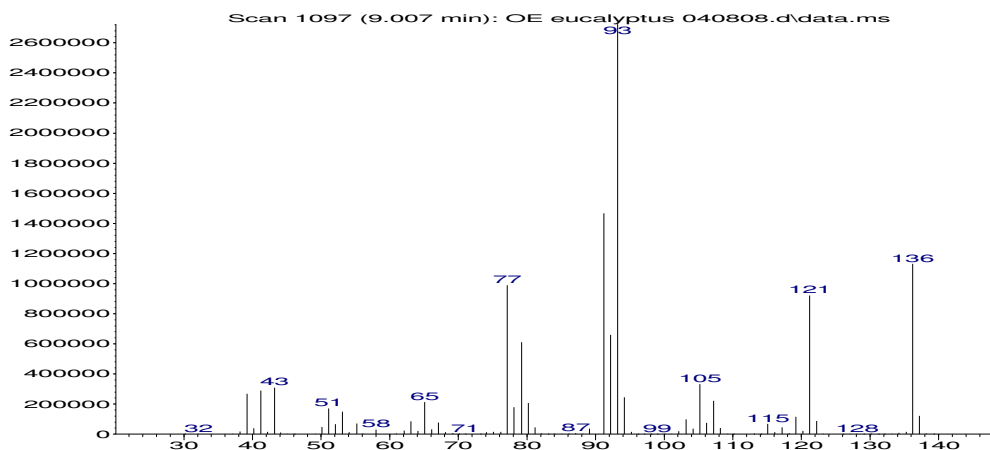


Abundance



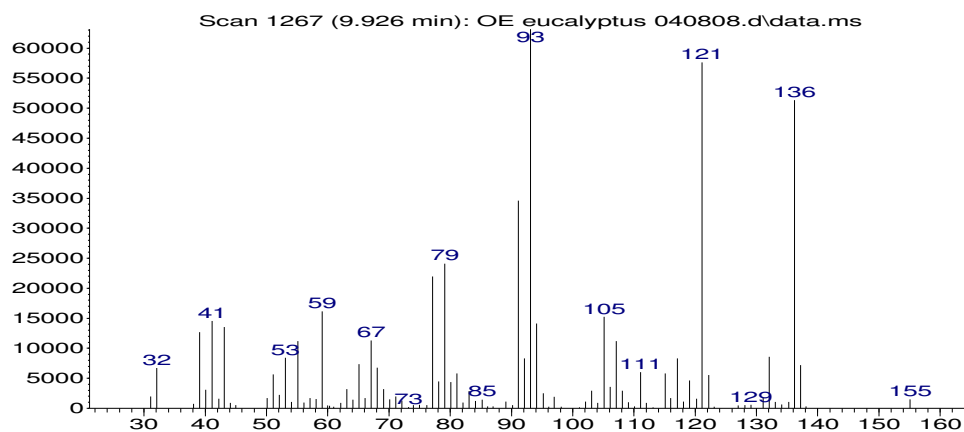
m/z--&gt;

Abundance



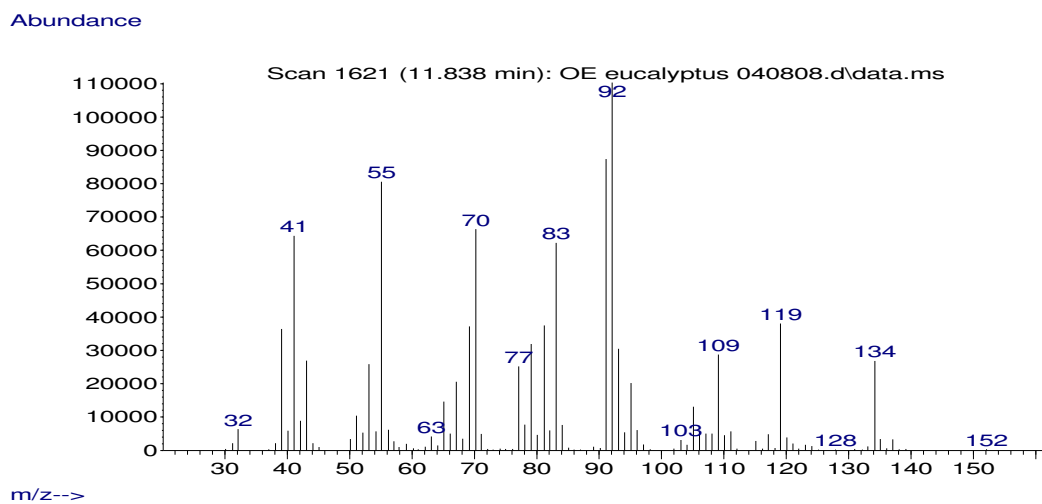
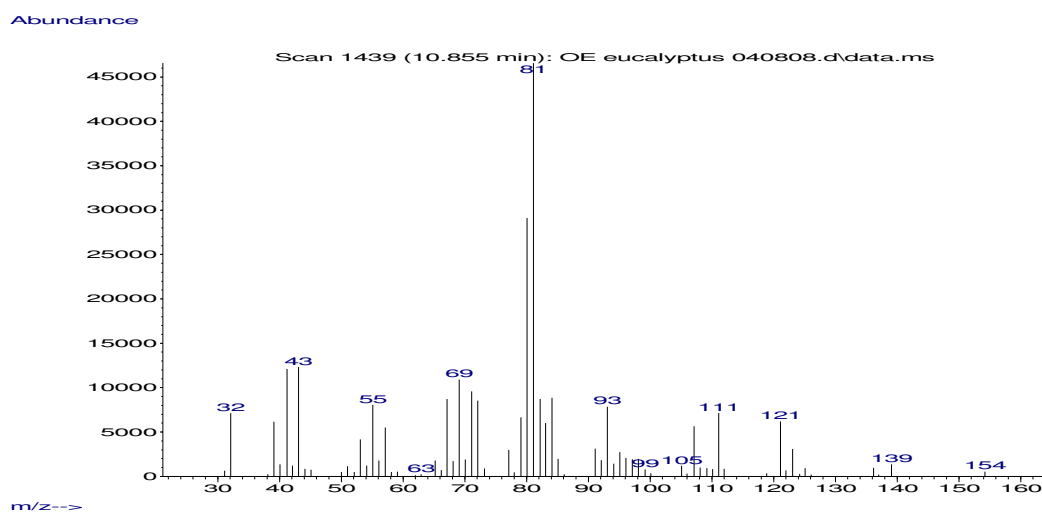
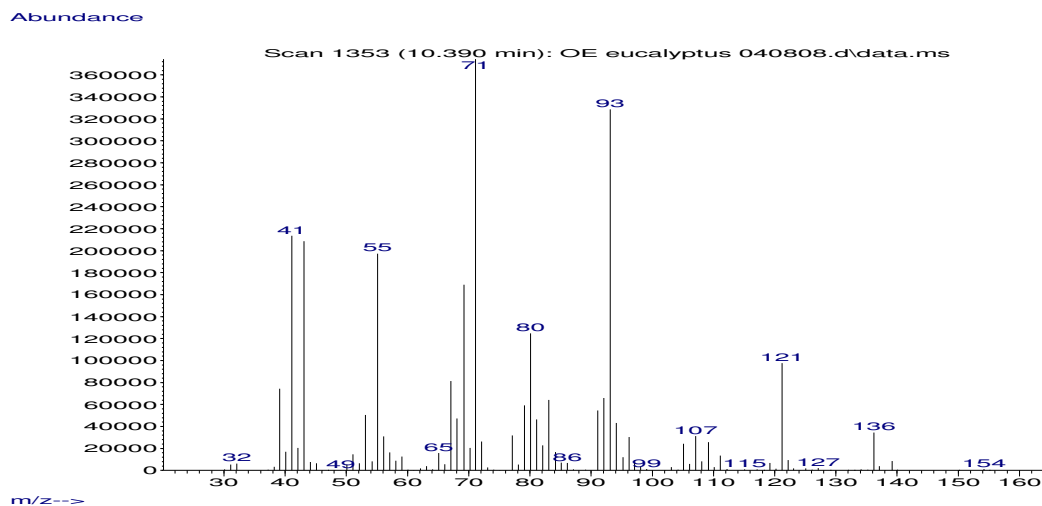
m/z--&gt;

Abundance

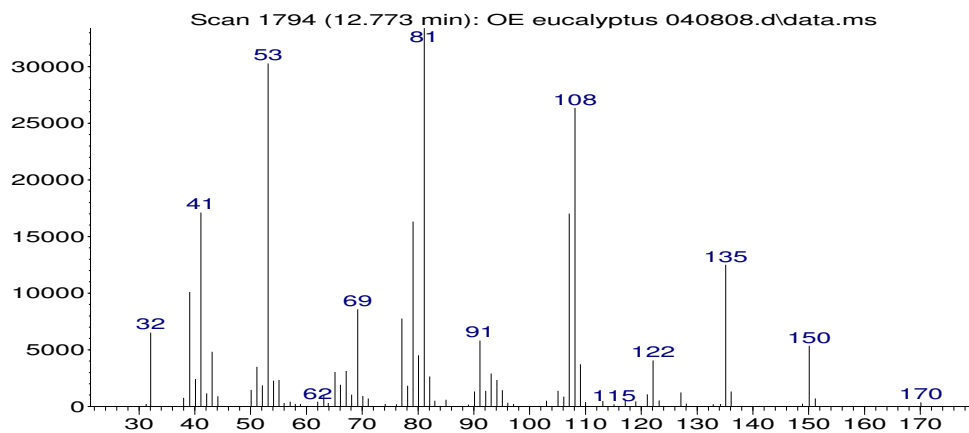


m/z--&gt;



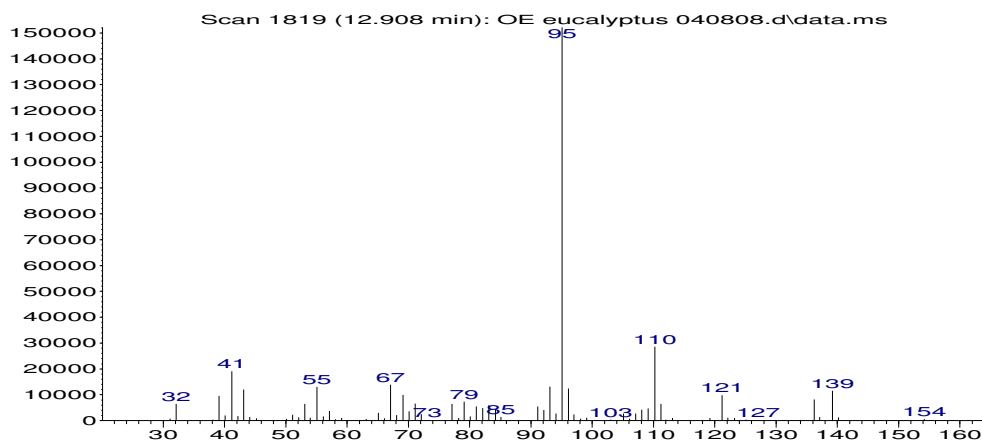


Abundance



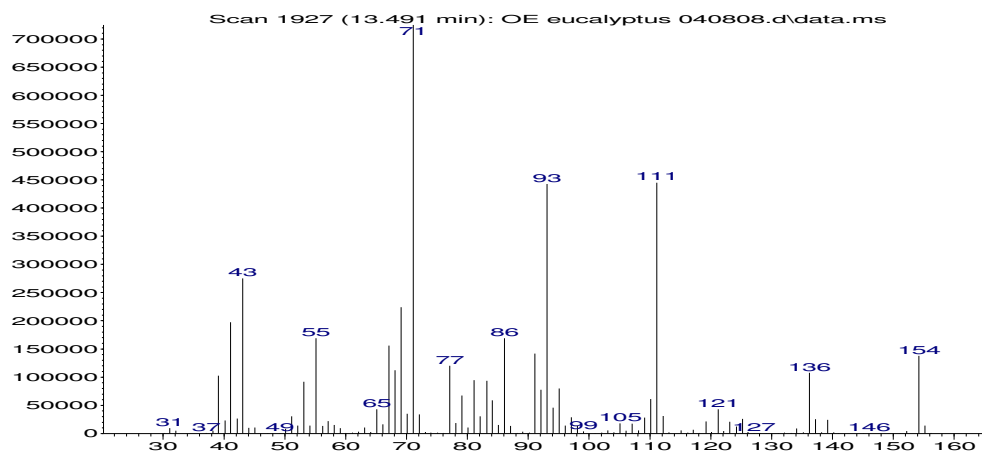
m/z--&gt;

Abundance



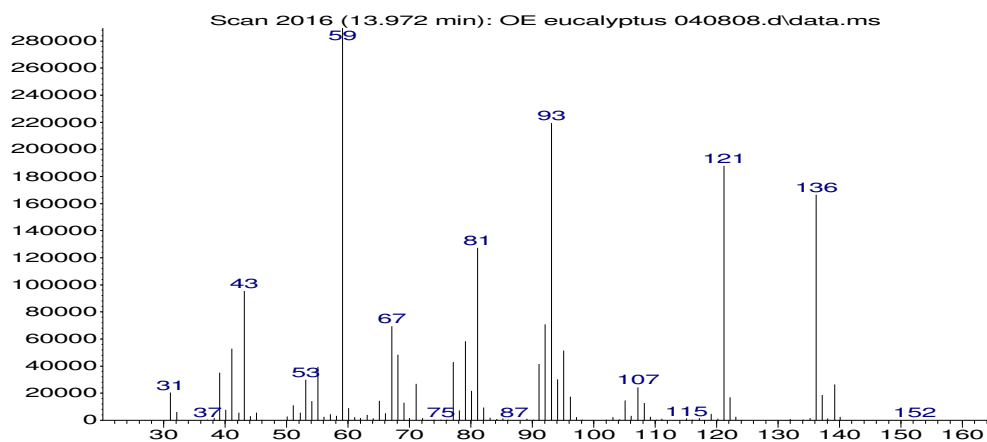
m/z--&gt;

Abundance



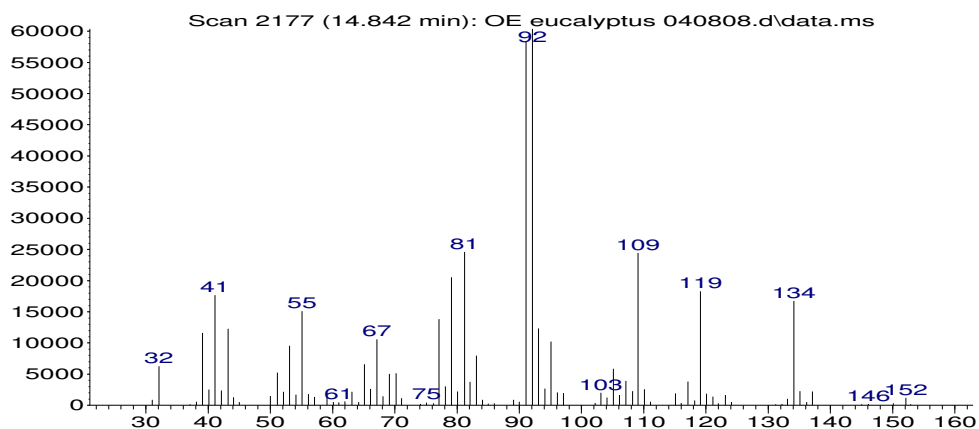
m/z--&gt;

Abundance



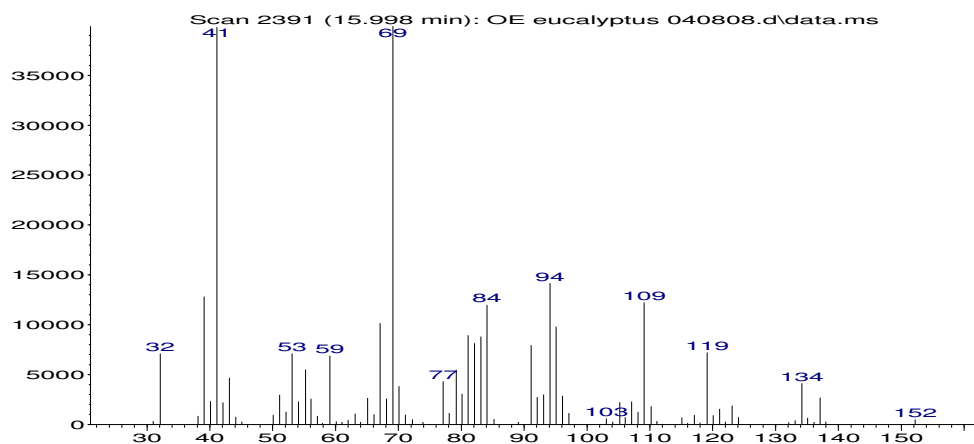
m/z--&gt;

Abundance



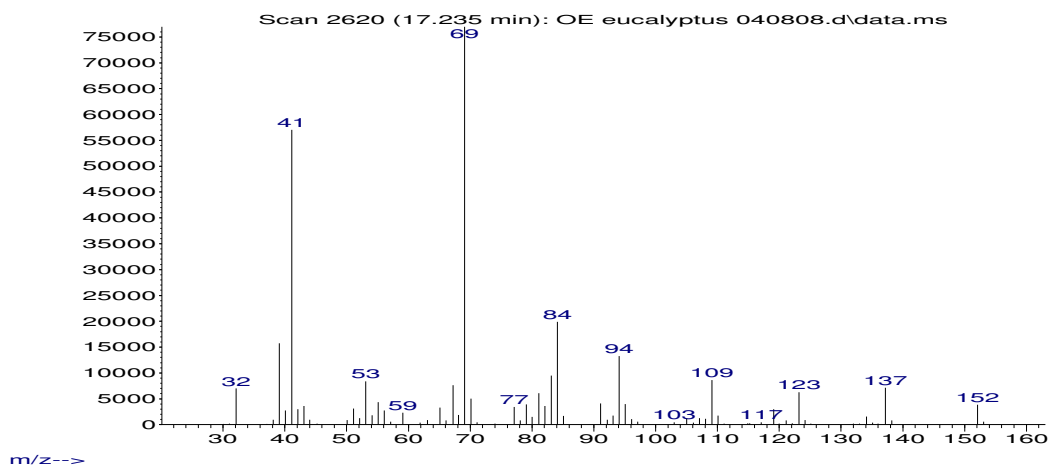
m/z--&gt;

Abundance

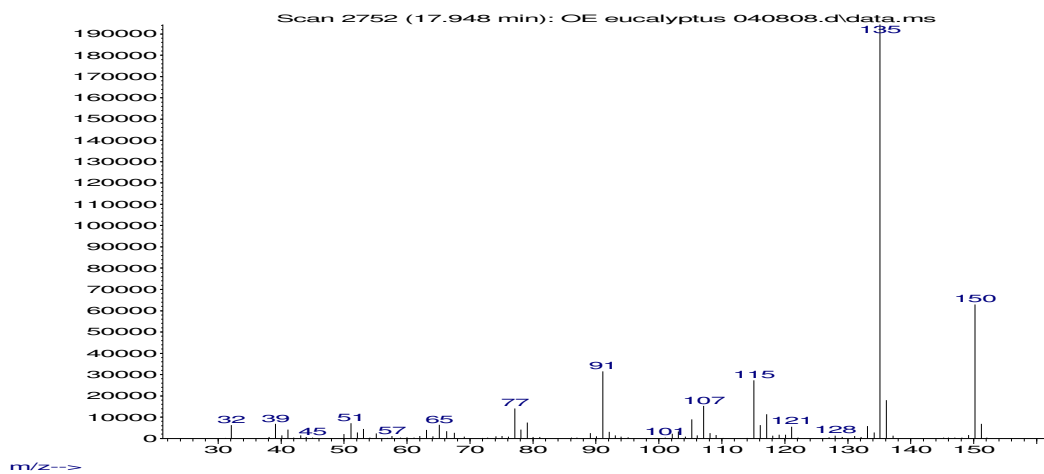


m/z--&gt;

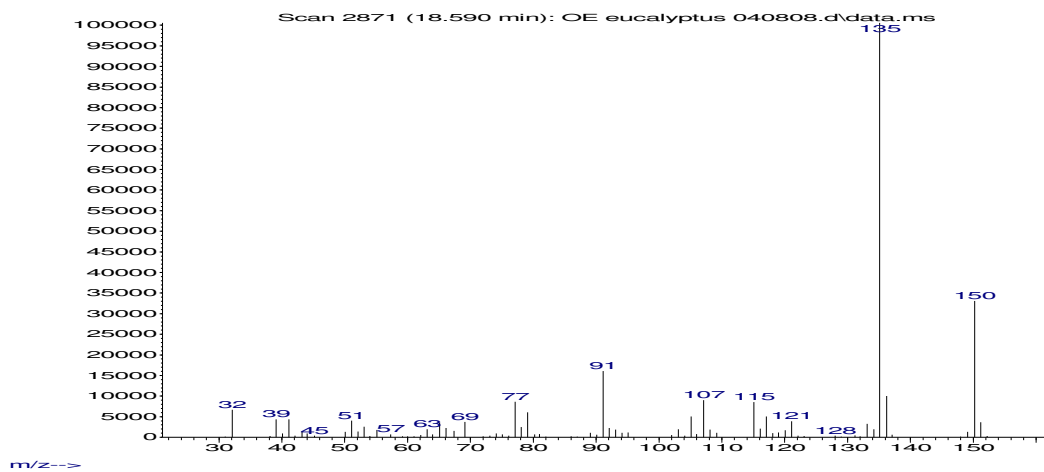
Abundance



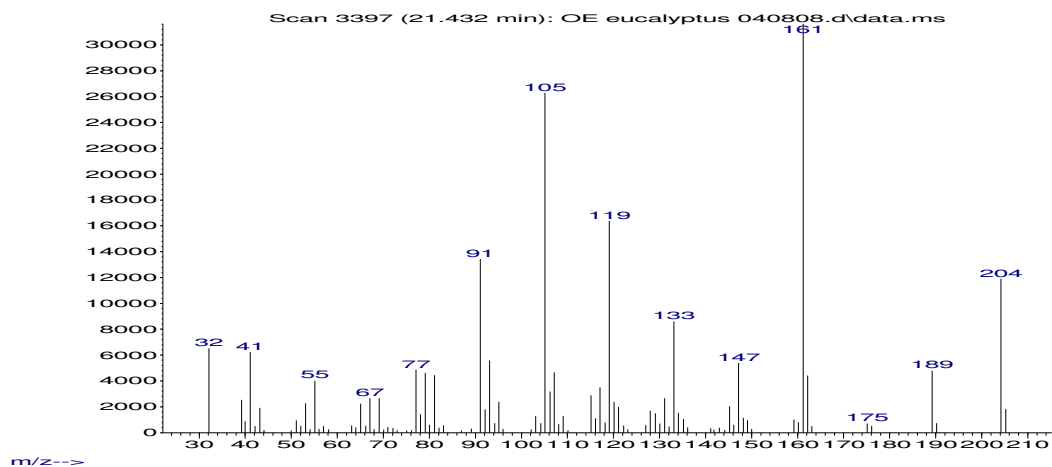
Abundance



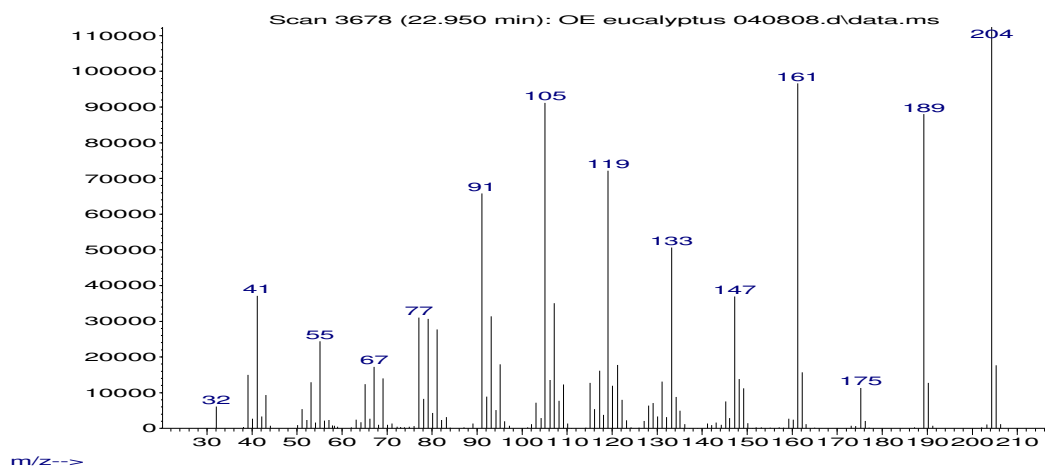
Abundance



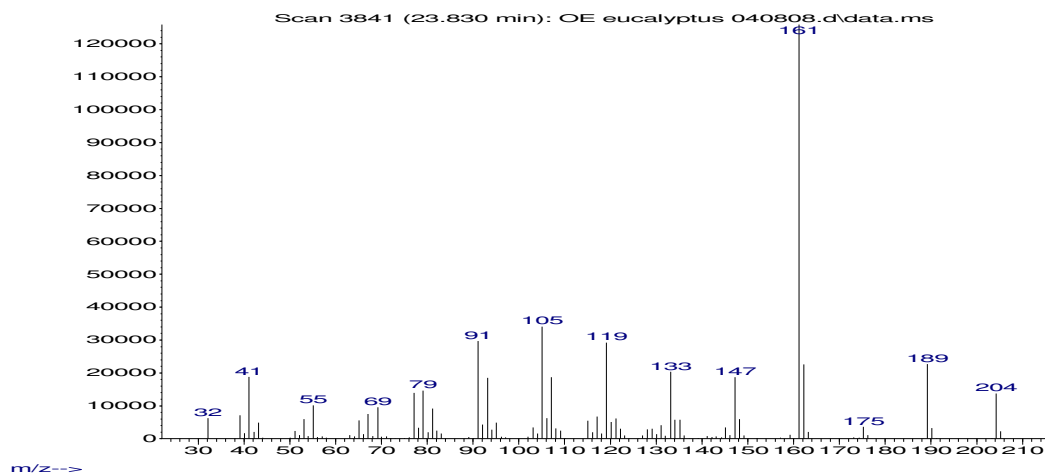
Abundance

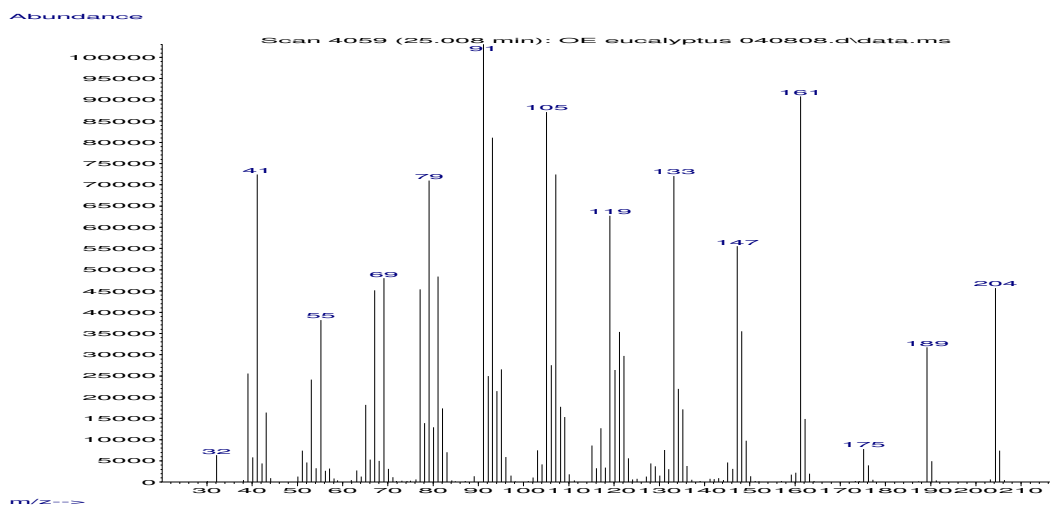
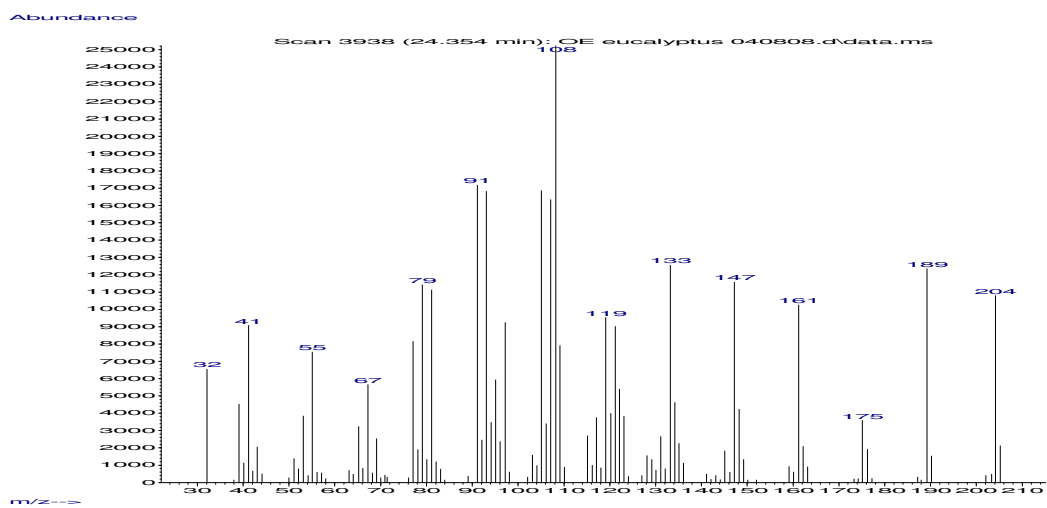
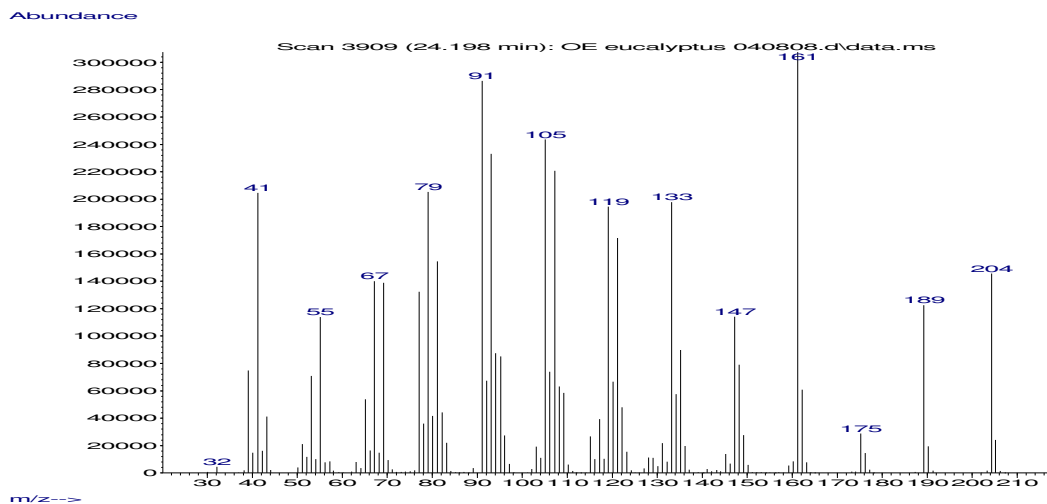


Abundance

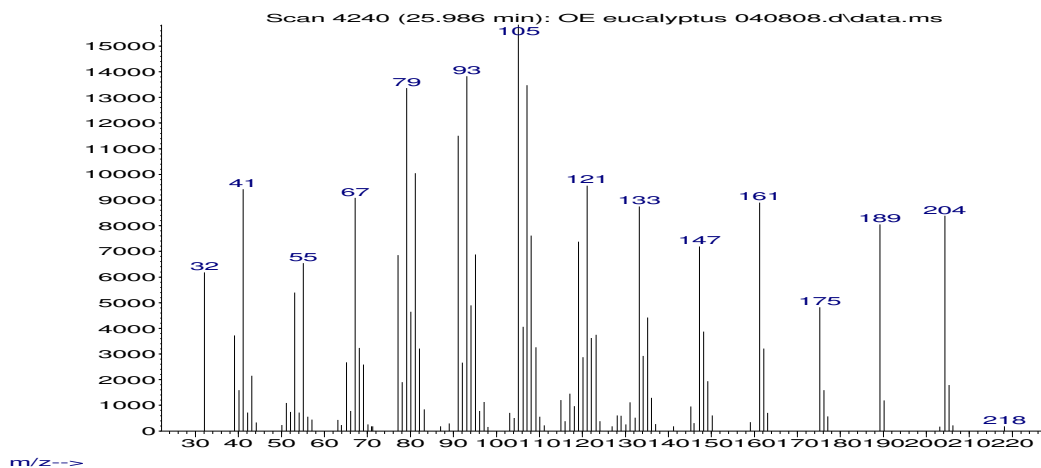


Abundance

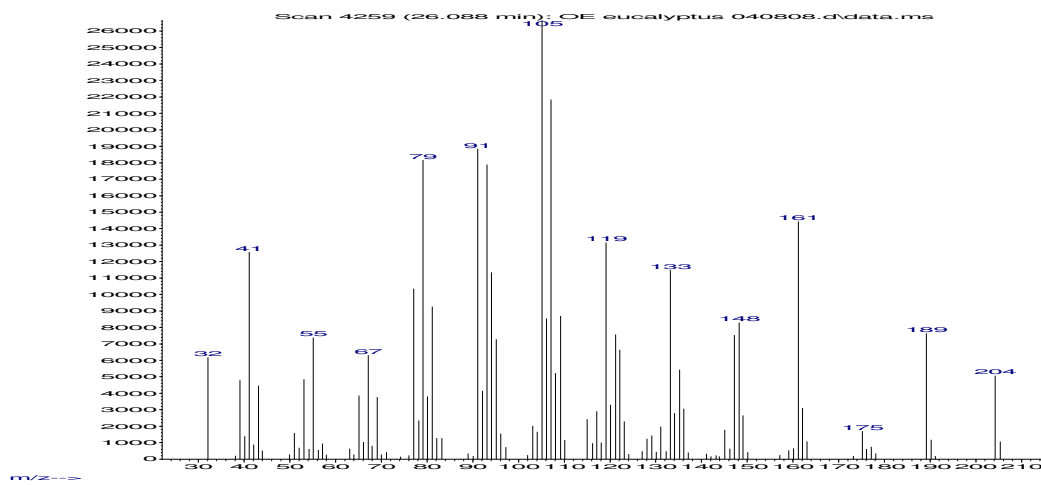




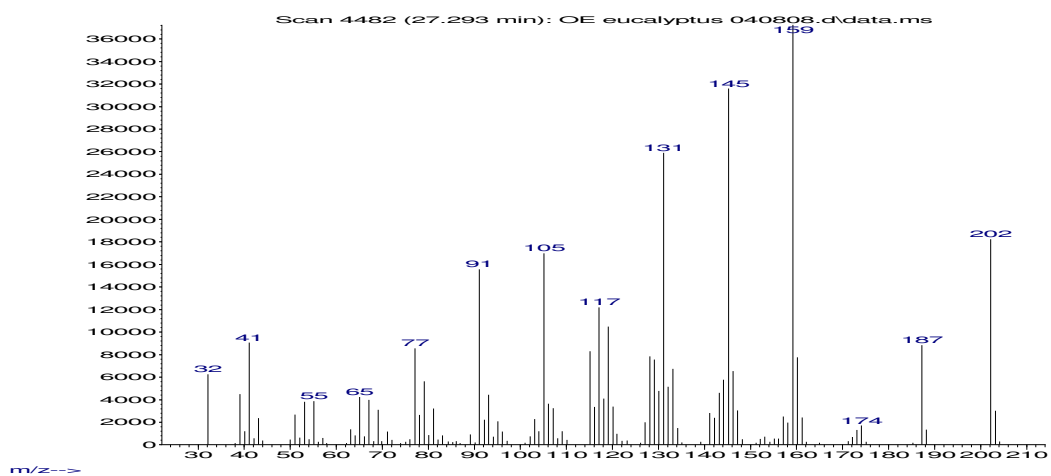
Abundance



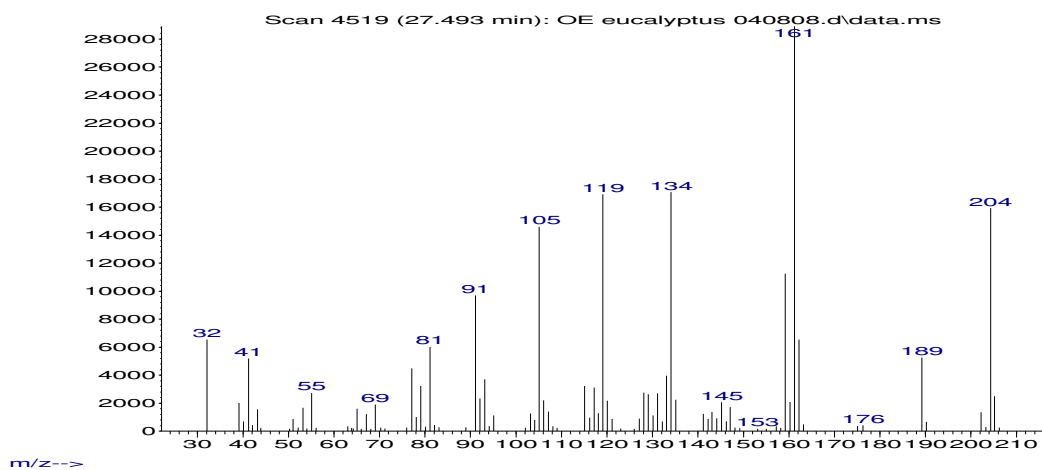
Abundance



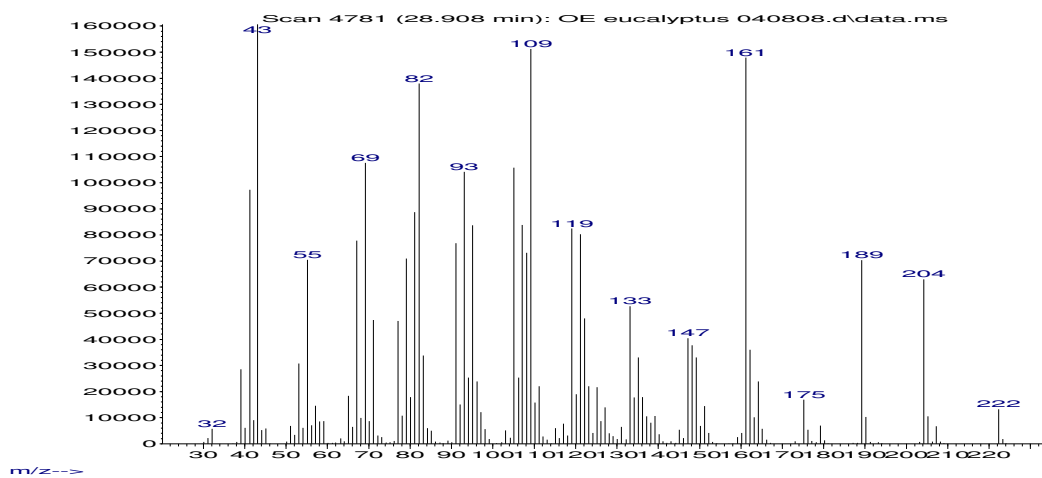
Abundance



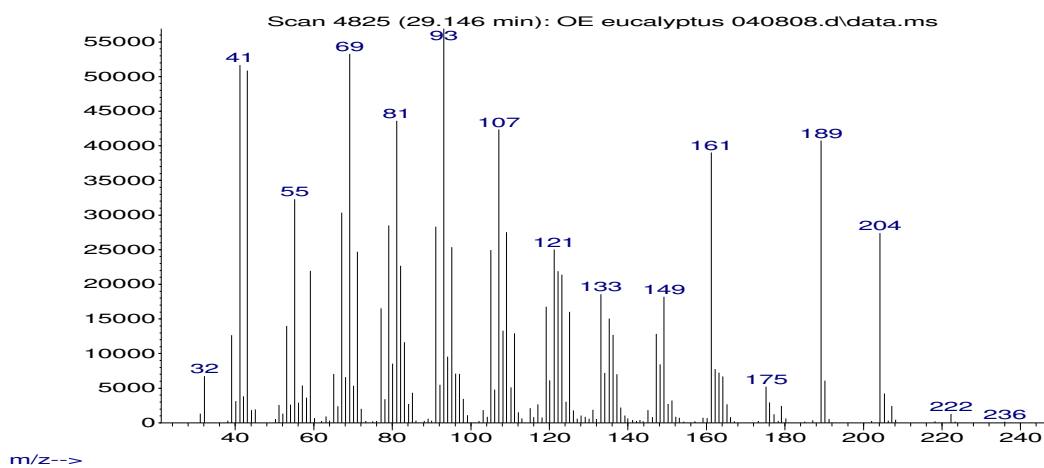
Abundance



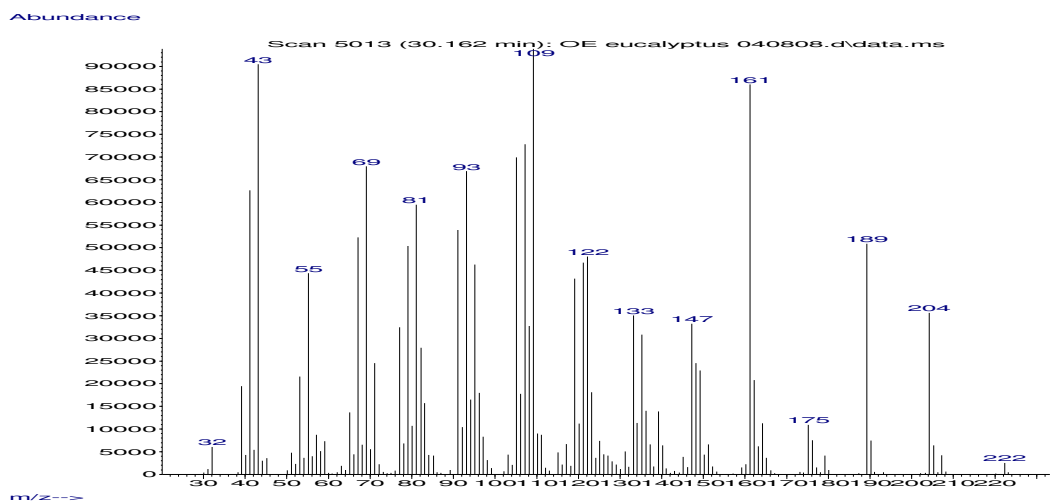
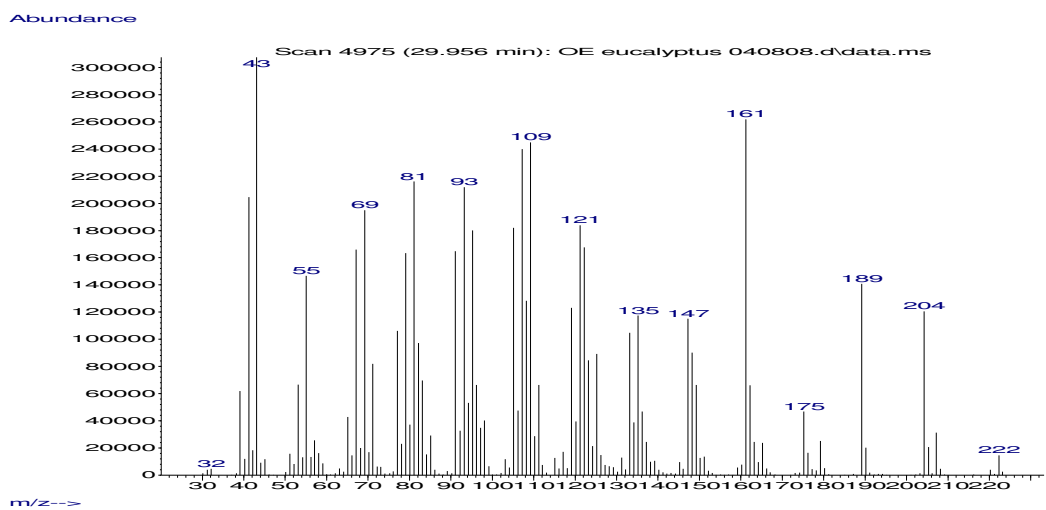
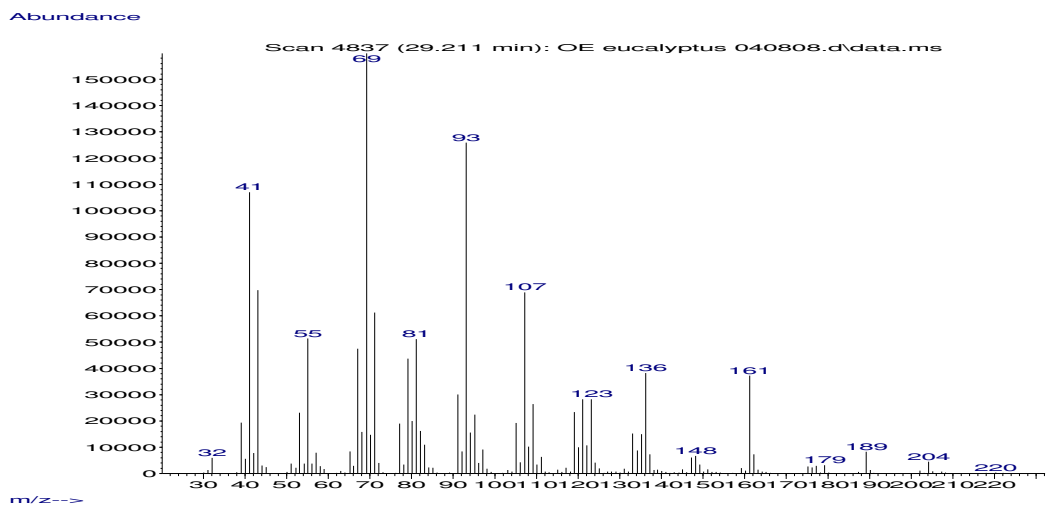
Abundance

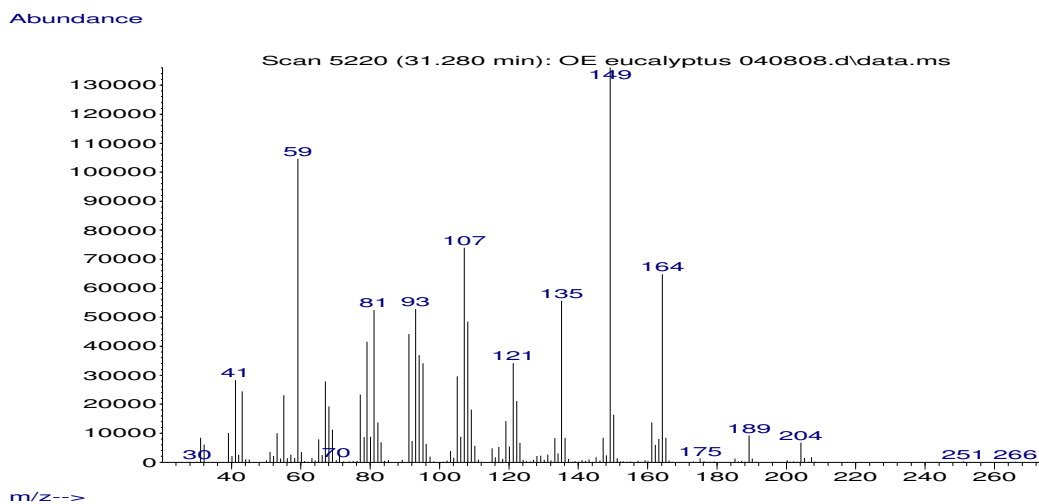
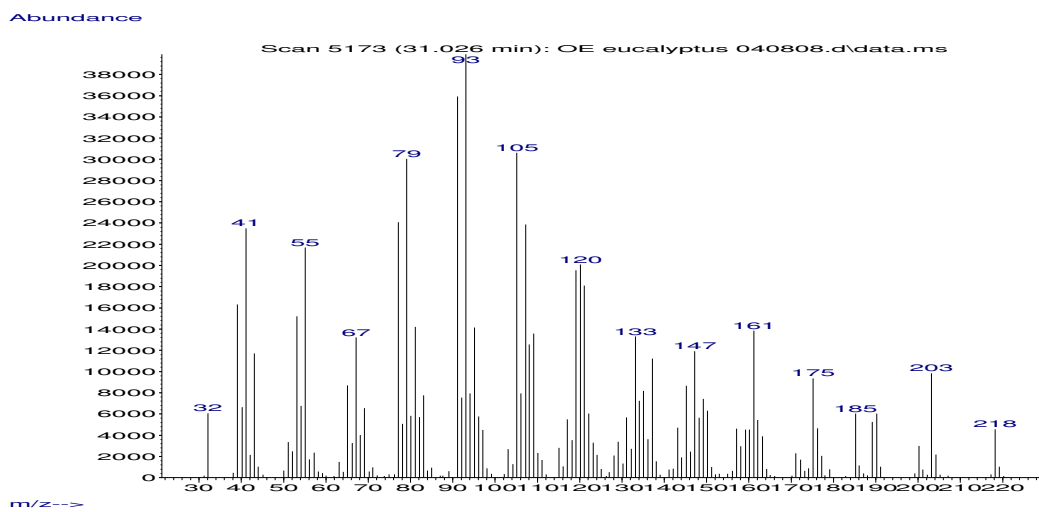
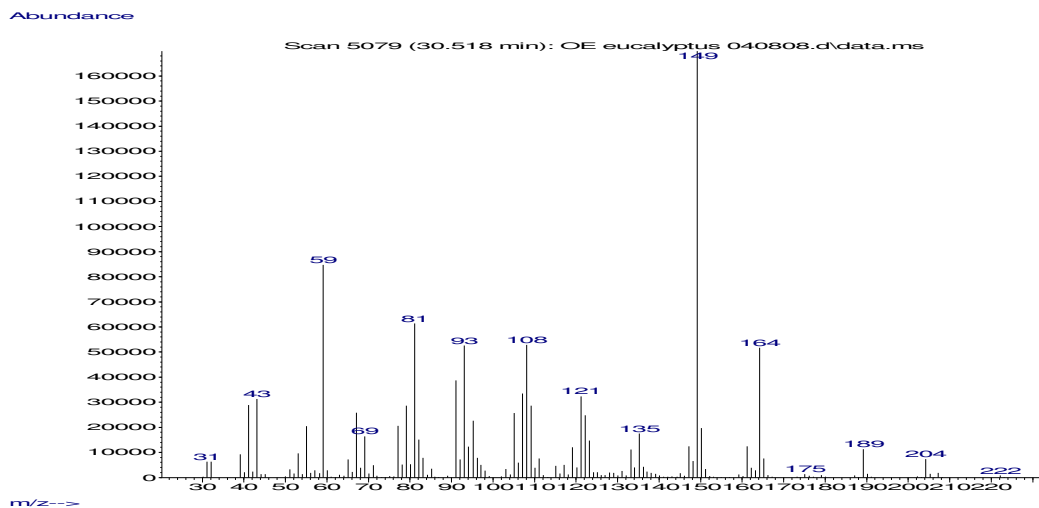


Abundance

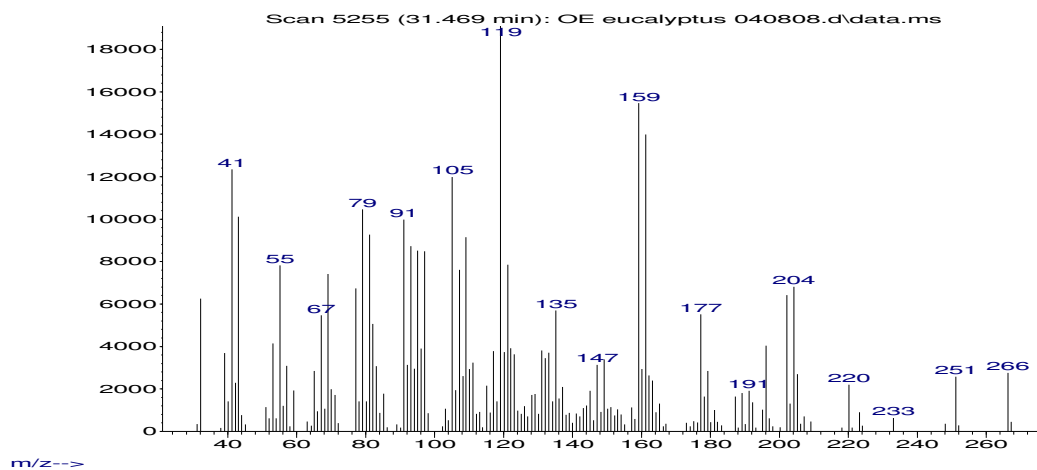




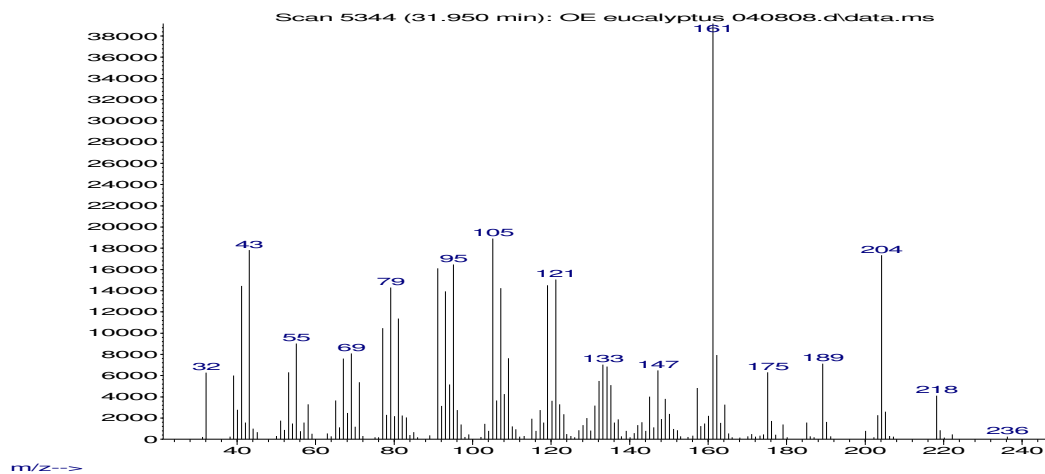




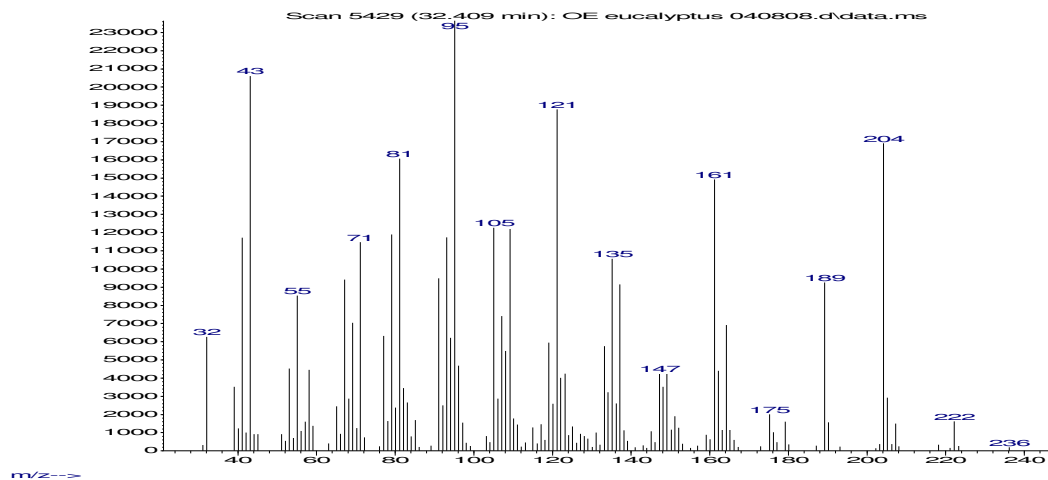
Abundance



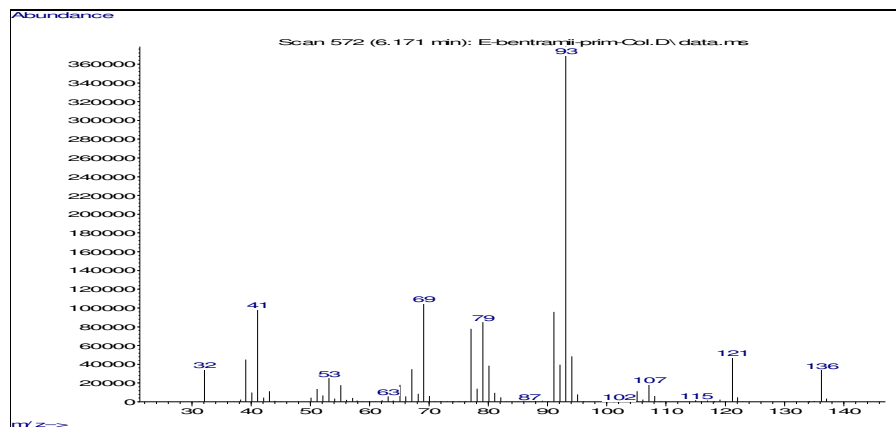
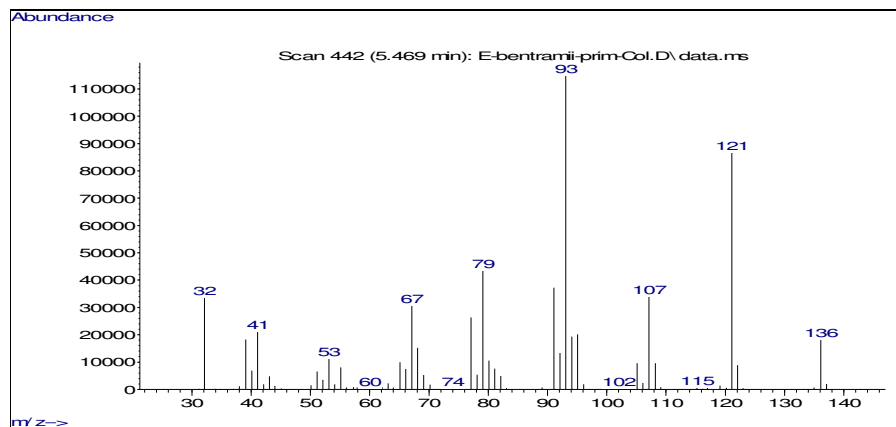
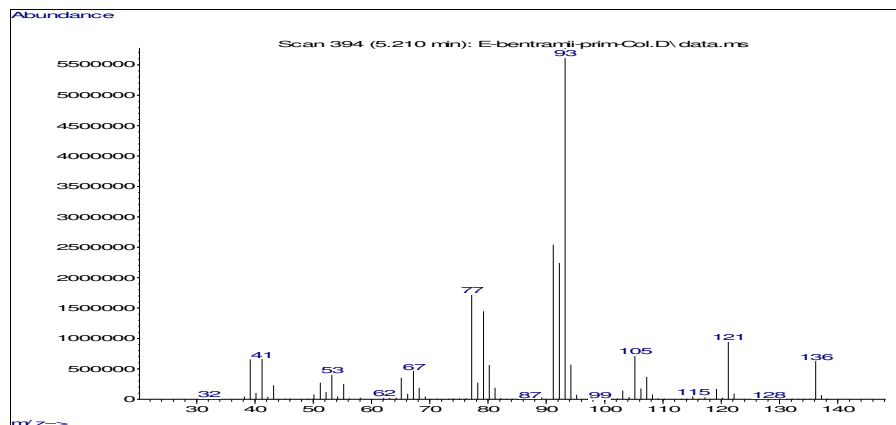
Abundance

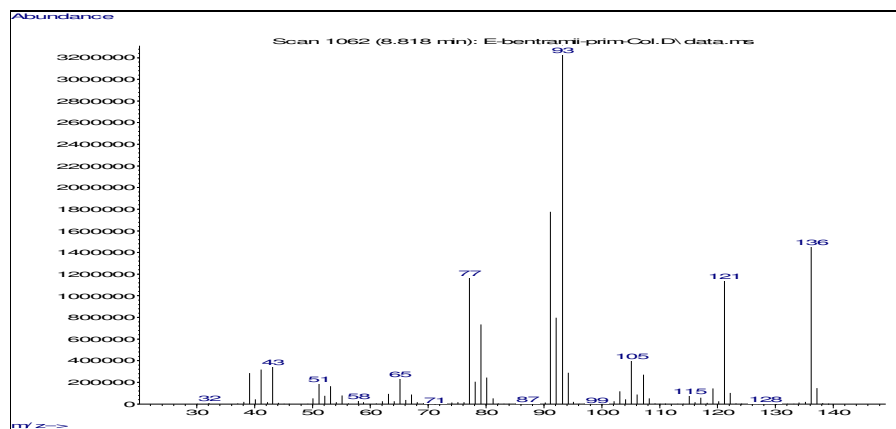
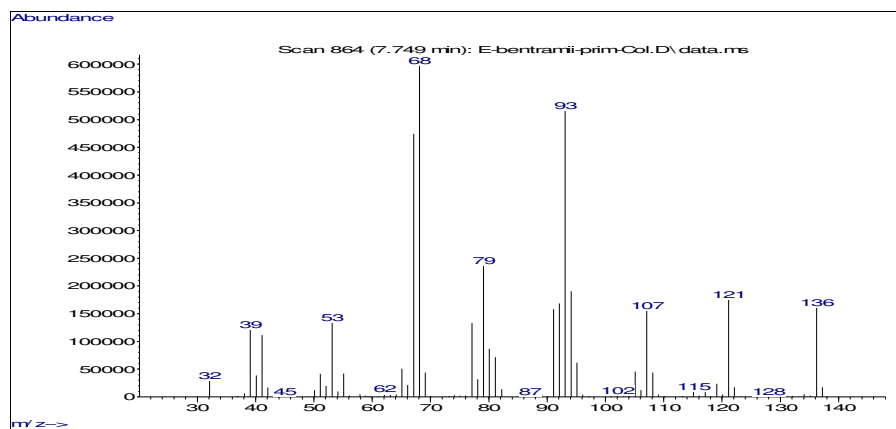
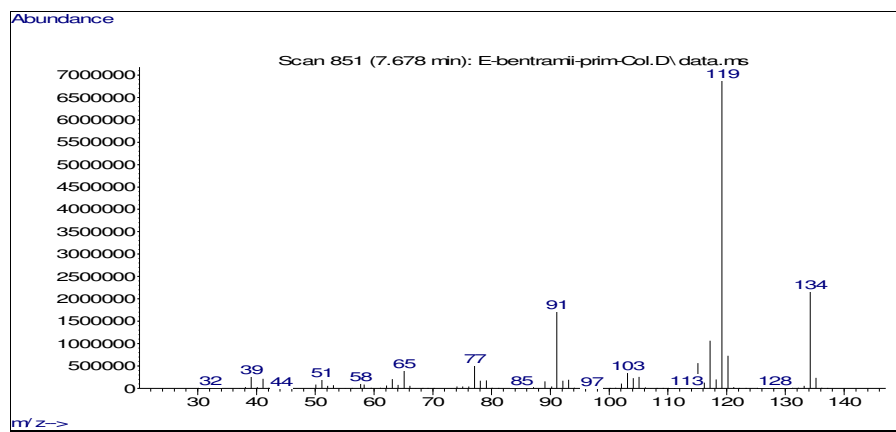


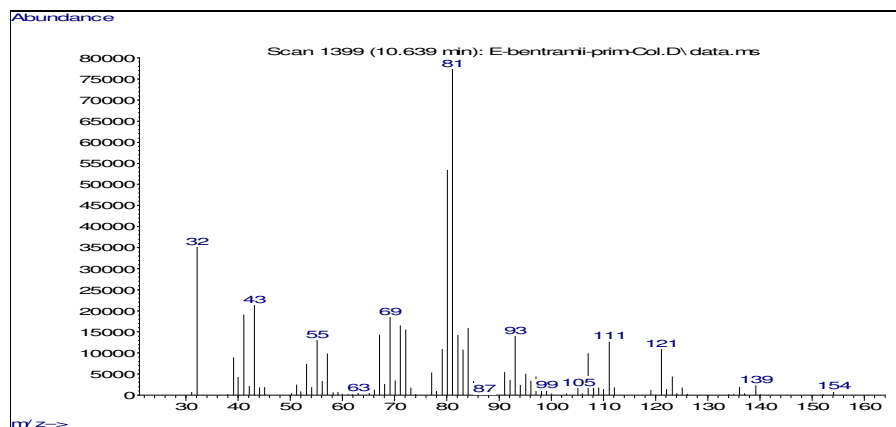
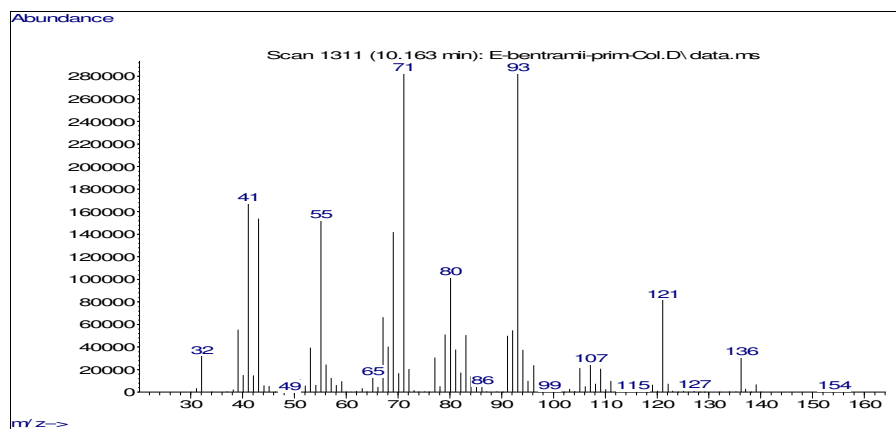
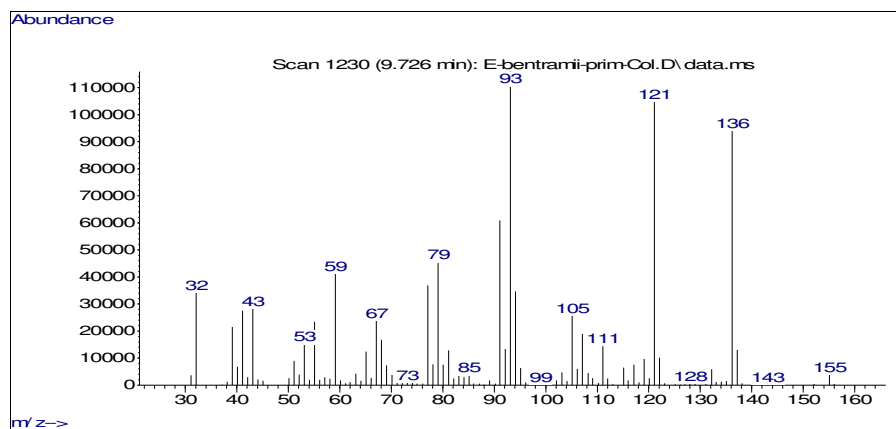
Abundance

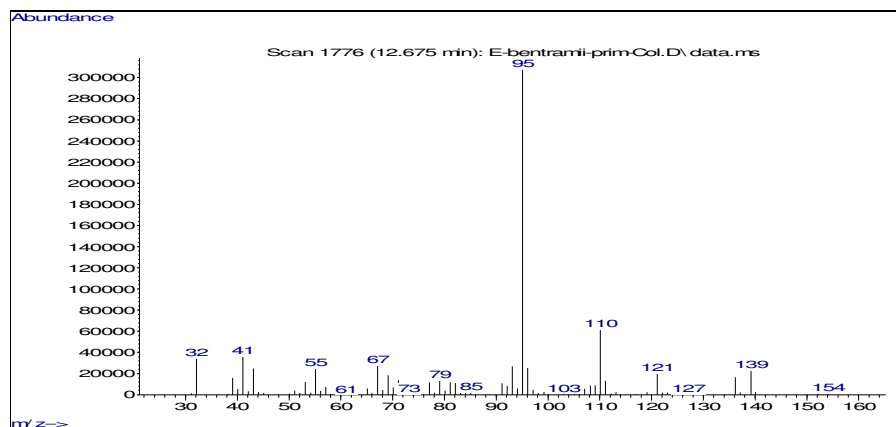
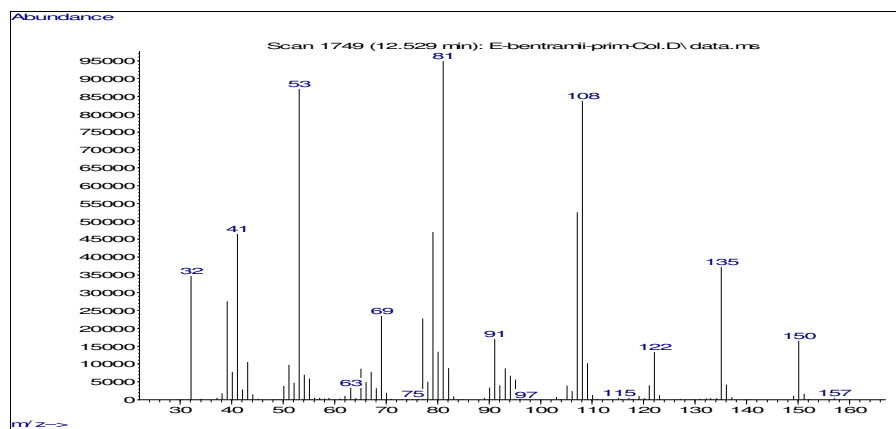
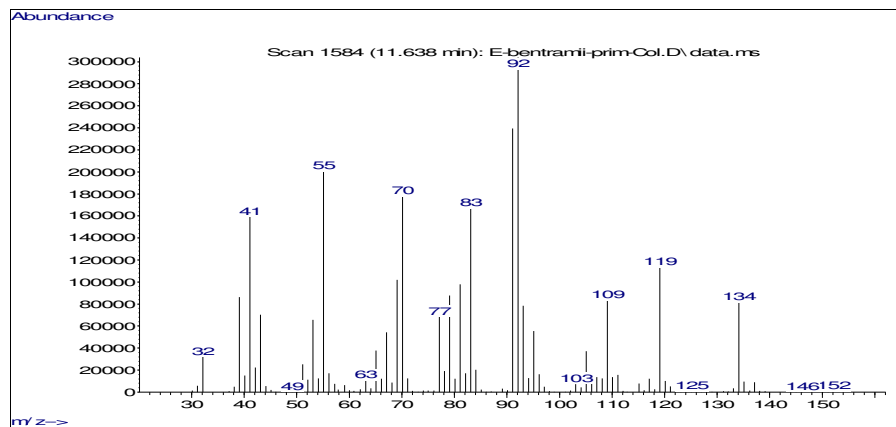


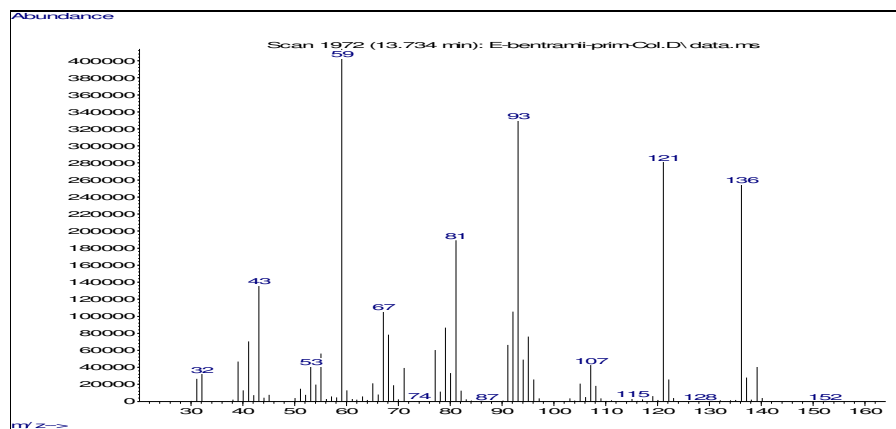
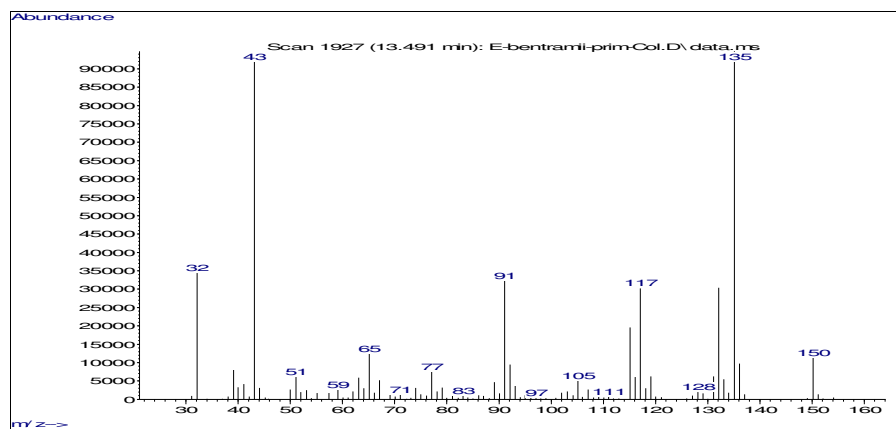
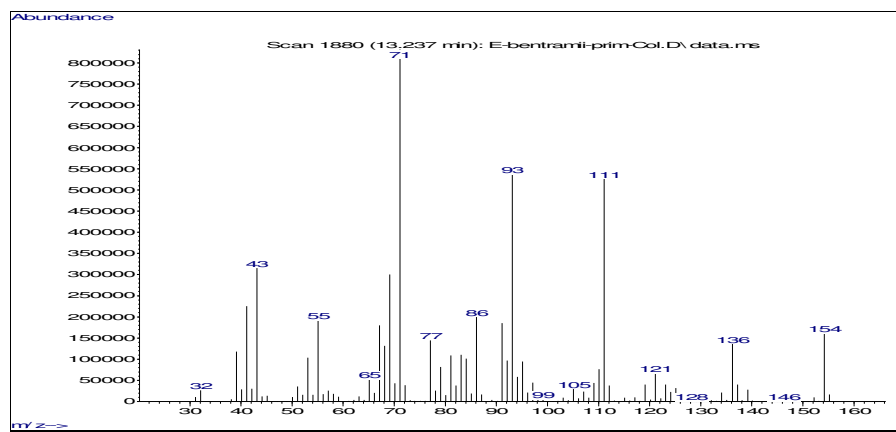
**APÊNDICE 3 – ESPECTROS DE MASSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. benthamii***  
**REFERENTES A COLETA DE PRIMAVERA**



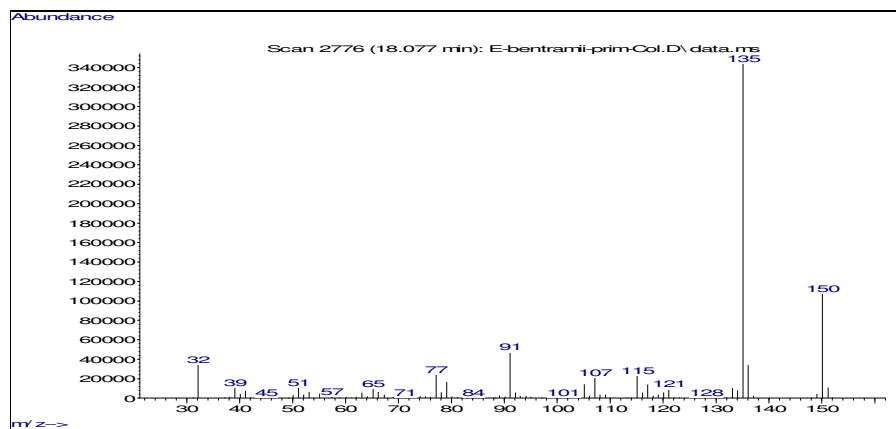
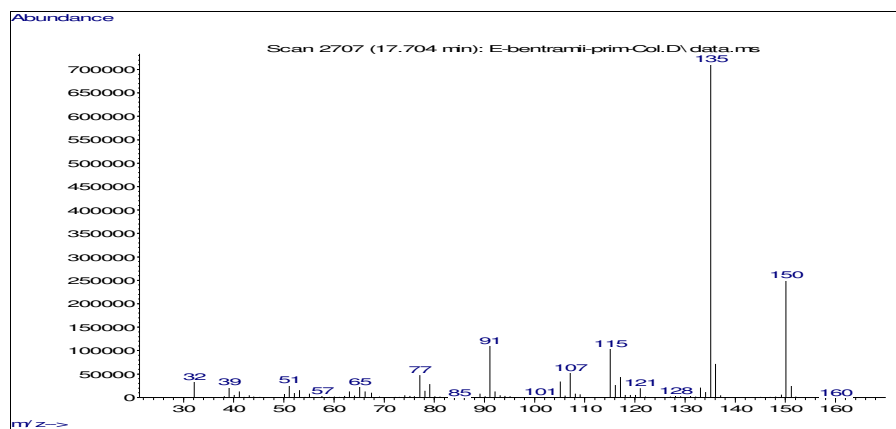
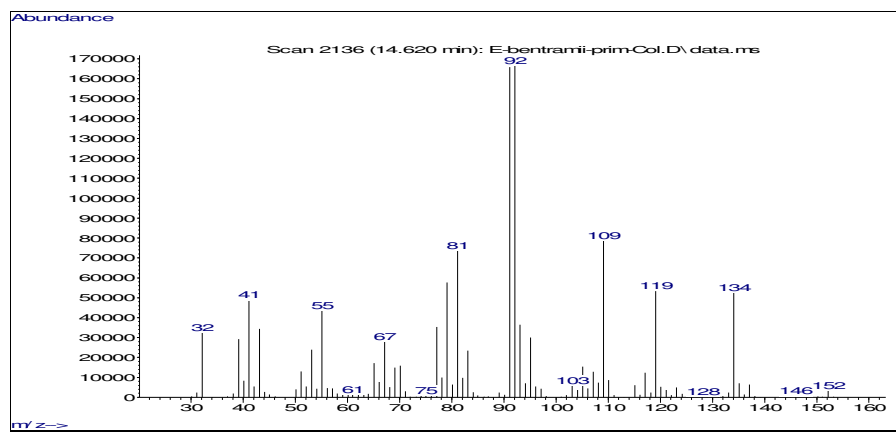


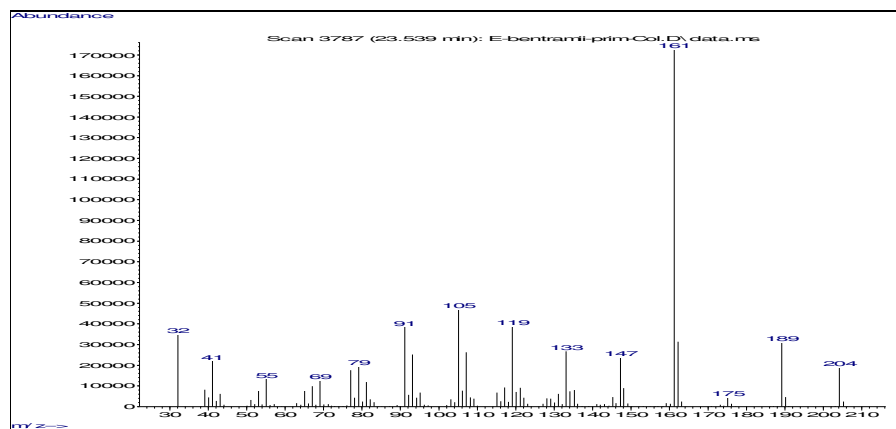
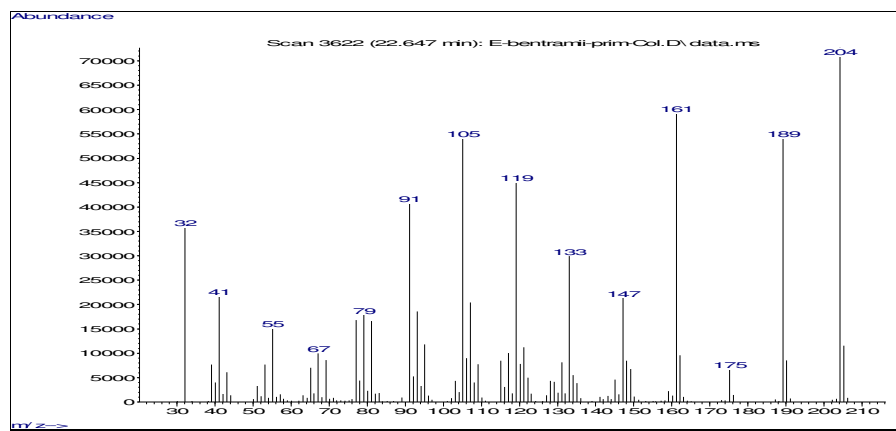
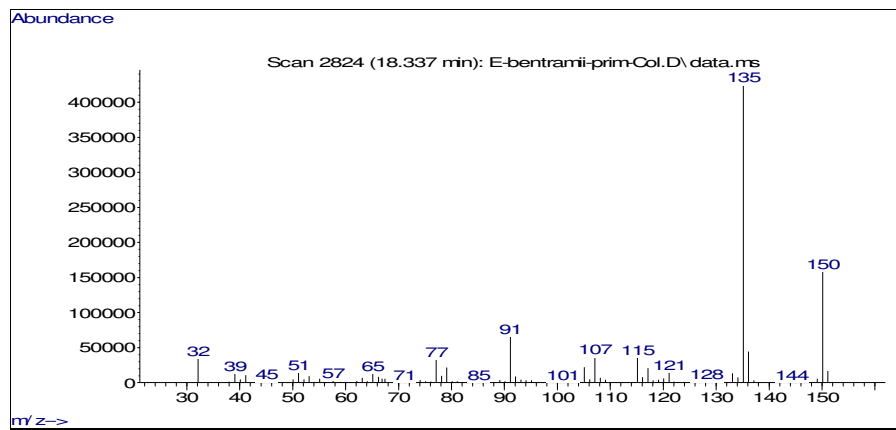


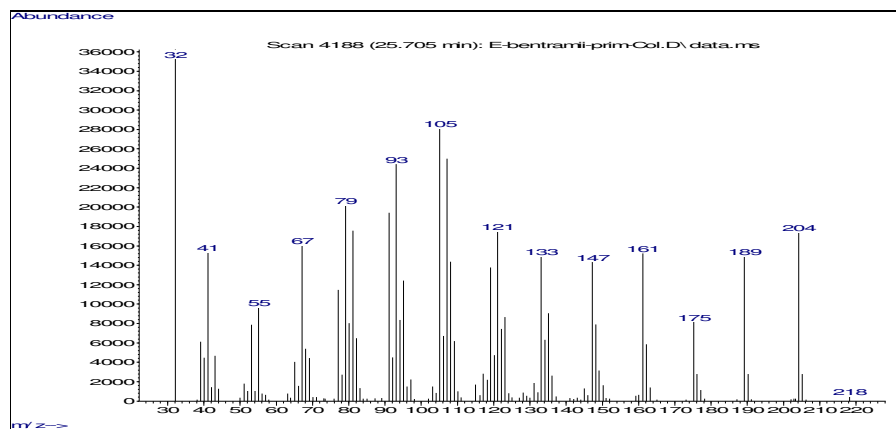
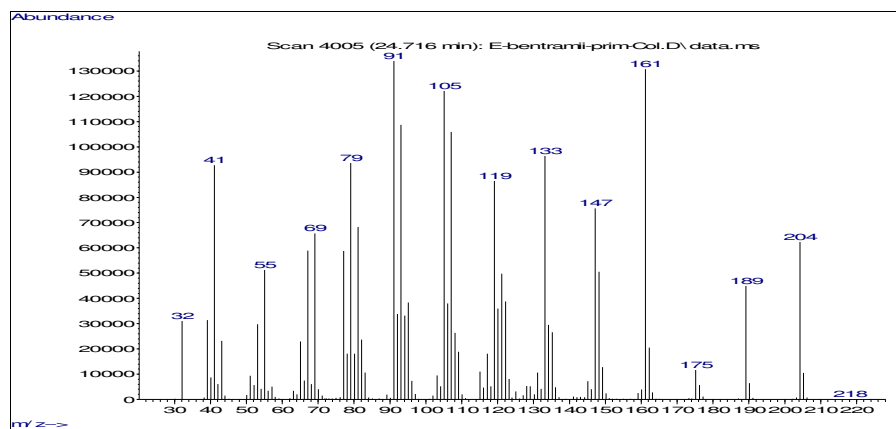
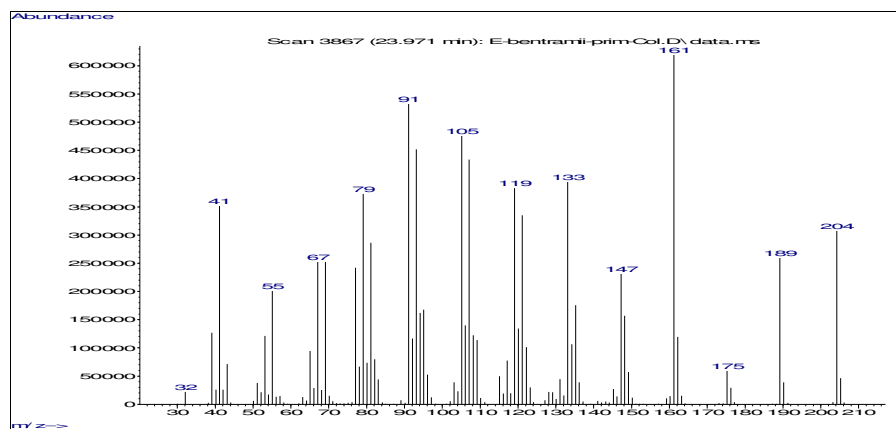


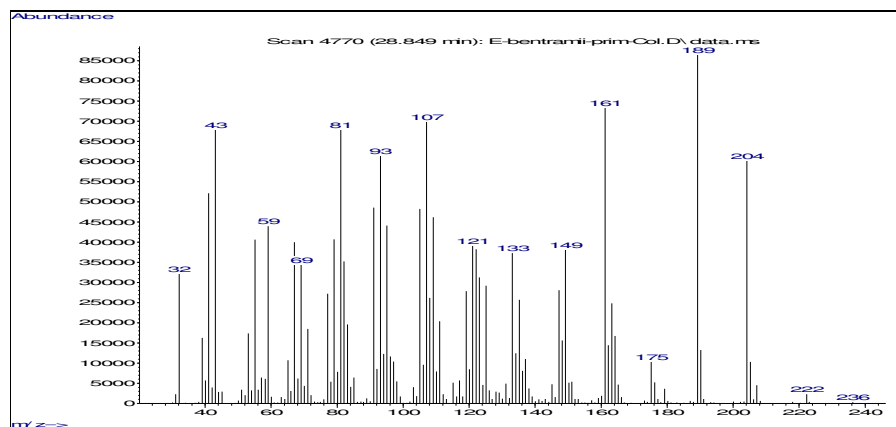
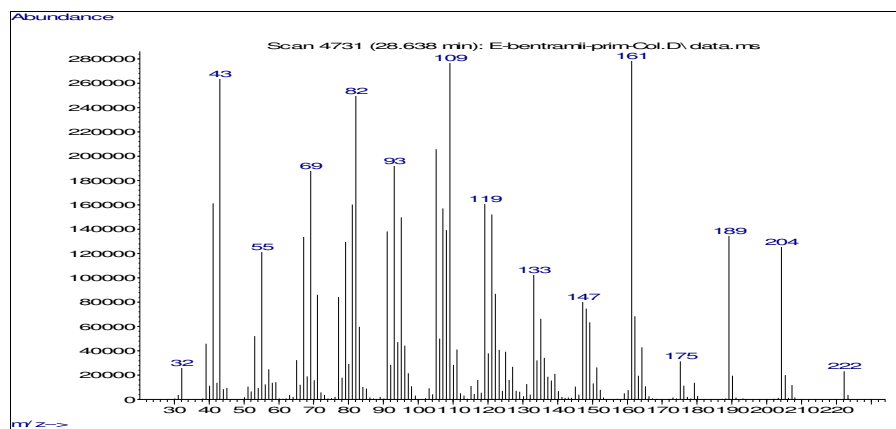
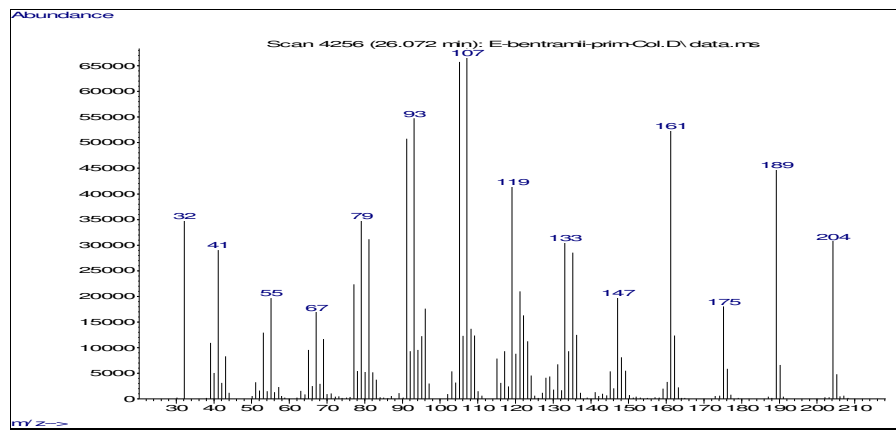


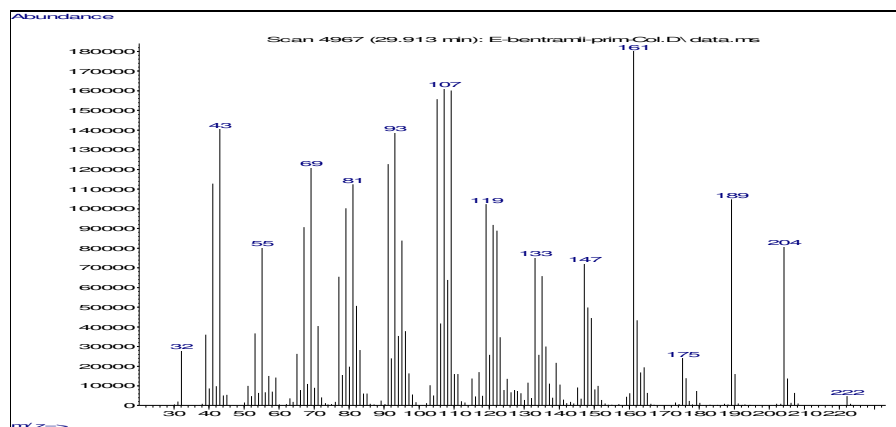
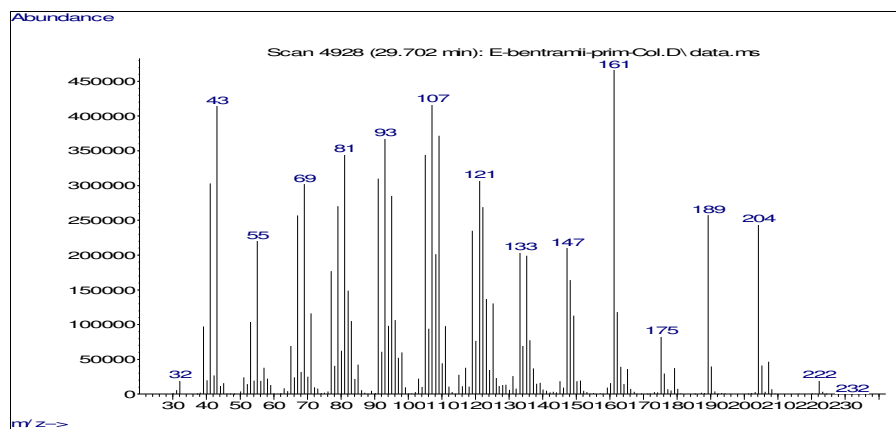
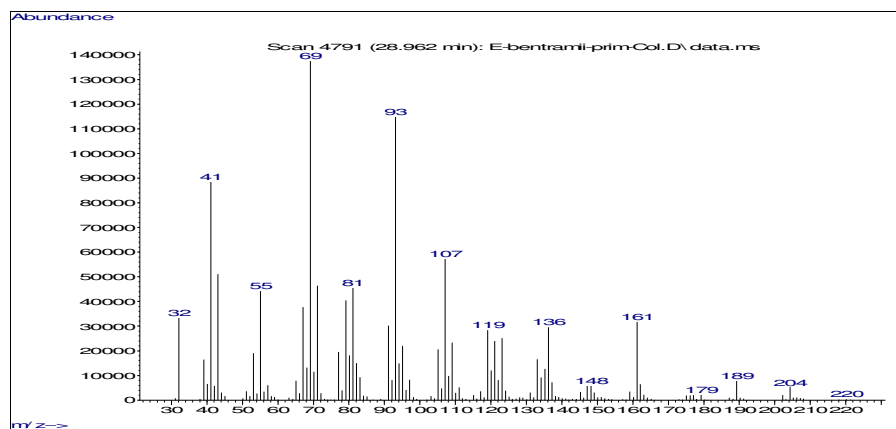


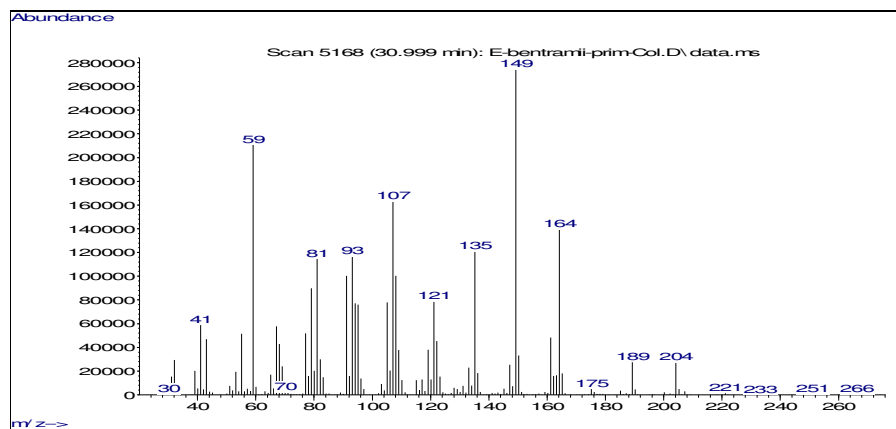
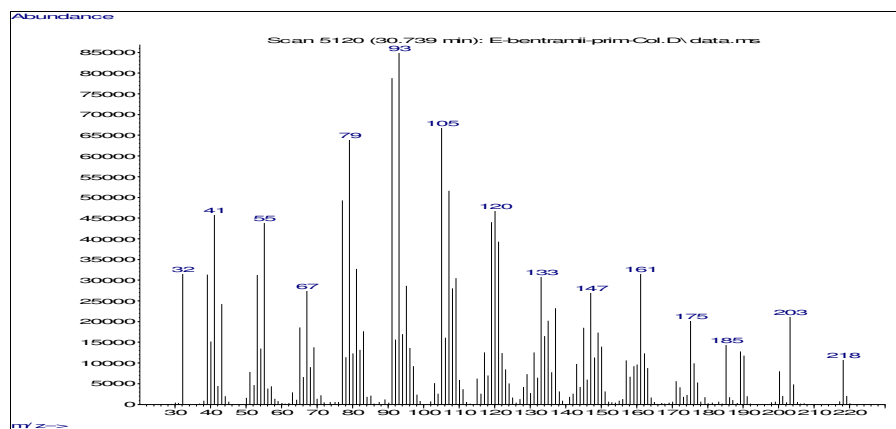
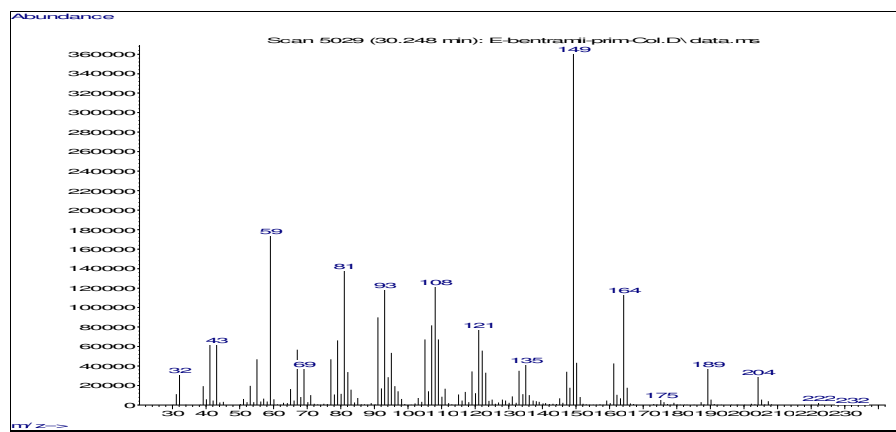


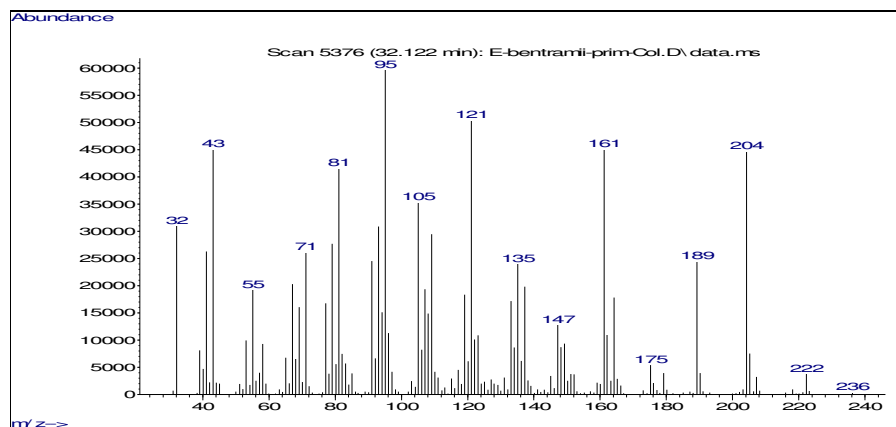
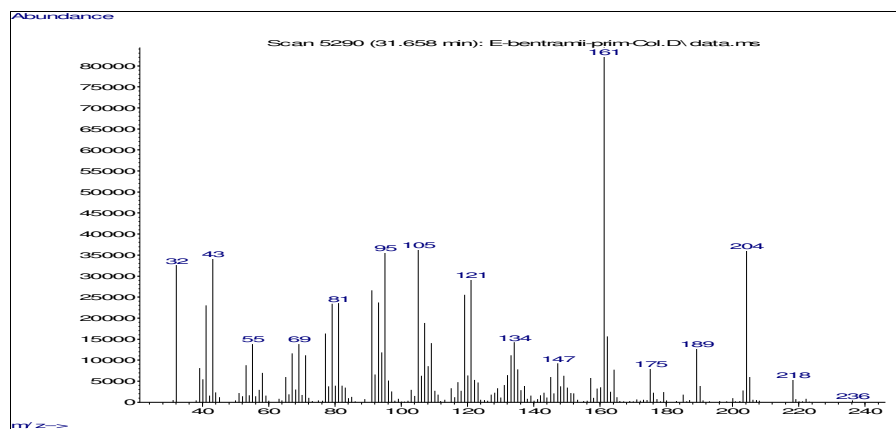
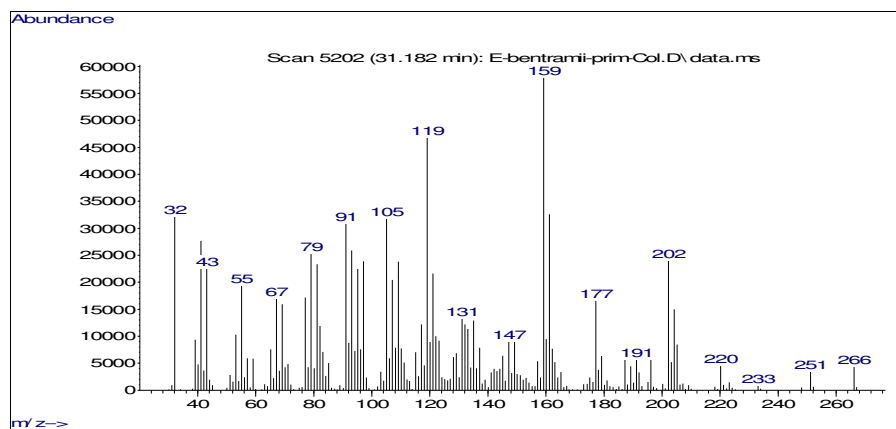












## ANEXO

**APROVAÇÃO DA COLETA DOS ESPÉCIMES DE *Pediculus humanus capitis*  
PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UEPG**



**PARECER Nº 12/2009  
Protocolo: 03167/09**

Em reunião ordinária, realizada dia 30 de abril de 2009, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Avaliação inseticida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage (Myrtaceae) contra *Pediculus humanus capitis* De Geer**". De responsabilidade da pesquisadora Rosilda Aparecida Kovalicnz.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório final: 30 de abril de 2010

Ponta Grossa, 11 de maio de 2009.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

  
Profa. MSc. Marlene Harger Zimmermann  
Coordenadora